

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

---

**VICTOR MORAX**

(1866-1935)

---

Durant douze semaines, notre collègue V. Morax a souffert d'un mal cruel dont il savait toute la gravité. Il a subi cette longue épreuve avec un tel courage, que ses amis, à chacune de leurs visites, emportaient un peu d'espoir en le quittant, souriant et résigné sur son chevet. Il a succombé le 14 mai dernier, moins de deux mois après la mort de son collaborateur d'autrefois, A.-C. Marie, dont ces *Annales* portaient hier le deuil.

V. Morax était né le 16 mars 1866 à Morges (canton de Vaud). En 1886, au lendemain de son baccalauréat, après un stage au laboratoire de chimie biologique du professeur Baumann à Fribourg-en-Brisgau, il projeta d'étudier la médecine à Paris et alla prendre conseil auprès de son ami Yersin, qui fréquentait déjà assidûment le laboratoire de la rue d'Ulm. M. Yersin le présenta à M. Roux. L'entrevue fut si cordiale et elle laissa dans l'esprit du jeune étudiant une impression si forte qu'elle décida de sa carrière scientifique.

Dès que notre Maison fut fondée, Morax obtint aisément

l'autorisation d'y travailler; il suivit un des premiers cours de Microbiologie et occupa un laboratoire en 1891. Il avait eu la bonne fortune de rencontrer Maurice Nicolle et de préparer l'internat des hôpitaux sous sa direction. Unis par le même enthousiasme et par les liens d'une affection qui ne devait jamais s'affaiblir, les deux jeunes gens nouèrent alors à l'Institut Pasteur une collaboration étroite, d'où naquit, en 1893, la méthode dite de Nicolle-Morax, aujourd'hui encore d'usage courant dans les laboratoires pour la coloration des cils microbiens.

Deux ans après la soutenance de sa thèse de doctorat (1894) sur l'étiologie bactérienne des conjonctivites aiguës, Morax distinguait une forme nouvelle de ces affections (1896) et en découvrait l'agent pathogène spécifique, le diplocoque, qui, depuis, porte son nom. La pièce où il poursuivait ces recherches, au second étage du bâtiment central de notre Institut, est restée longtemps pour nous le « Laboratoire de Morax ».

Formé à l'école de Roux, il pressentait que les germes pathogènes qui se multiplient à la surface de la muqueuse oculaire doivent agir surtout par l'intermédiaire de substances diffusibles, capables, à elles seules, de provoquer l'inflammation de la conjonctive, et il s'efforça de mettre en évidence ces toxines phlogogènes. Avec Elmassian (1898), il réussit à reproduire la diphtérie oculaire chez le lapin au moyen d'instillations répétées de toxine diphtérique sur la conjonctive; il démontra que ce poison est absorbé à la longue par la muqueuse saine et qu'il franchit aisément cette mince barrière lorsqu'elle est lésée par un traumatisme ou une action caustique. Des essais analogues, réalisés avec des cultures filtrées de bacille de Weeks ou de diplobacille (1899), lui ont permis d'y déceler également des substances irritantes pour la conjonctive de l'homme et du lapin. Ces travaux et ceux qui les ont suivis sur le rôle pathogène du gonocoque, du pneumocoque, du streptocoque, du bacille de Koch, du bacille de la lèpre, des *Sporotrichum*, des trypanosomes et d'autres germes dans les affections de l'œil, forment une œuvre si complète et si homogène que, s'il existe maintenant une microbiologie oculaire très cohérente, on peut dire que c'est à Morax que nous le devons.

L'intérêt que V. Morax portait à l'étude des toxines micro-



biennes fut l'origine de sa collaboration avec A.-C. Marie. On sait combien elle fut féconde : action de la chaleur sur les spores tétaniques (1902); absorption de la toxine tétanique par les nerfs périphériques; affinité de la toxine tétanique pour la substance cérébrale; absence totale de ce poison dans les nerfs optiques, ce qui corrobore les données anatomiques suivant lesquelles les nerfs de la II<sup>e</sup> paire ne sont qu'un prolongement de la substance blanche du cerveau (1902-1903).

Toutes ces recherches qu'il poursuivait à l'Institut Pasteur, Morax les menait de front avec son service dans les hôpitaux, ses études sur la pathologie et la chirurgie oculaires et la fréquentation assidue des Sociétés savantes, où il apportait dans la discussion le fruit de son inlassable labeur. Il y ajoutait encore la préparation des concours; en 1900, il fut nommé ophtalmologiste des hôpitaux, dont le titre venait d'être créé.

En 1903, il prit la direction du service d'ophtalmologie de l'hôpital Lariboisière qu'il réorganisa complètement; il ne tarda pas à grouper autour de lui une foule de médecins et d'élèves du monde entier.

S'il consacra alors presque tout son temps à ses malades et à un enseignement qui mit au premier plan l'ophtalmologie française et valut à notre cher collègue l'honneur d'être considéré comme l'un des plus éminents spécialistes des affections oculaires, Morax continua cependant de faire partie de notre Maison. Il participait chaque année au cours de microbiologie par une leçon sur le gonocoque, s'intéressait à tous les événements de la famille pastorienne et à l'activité scientifique des pastoriens, à leur santé aussi, car il ne cessa jamais d'être pour eux, selon l'expression de M. Roux, « l'ami secourable » vers lequel on se dirige aux heures de détresse ou de maladie.

Lorsque l'âge de la retraite le contraignit à quitter le service de Lariboisière, ce magnifique foyer auquel il avait donné tant de renommée, Morax revint vers nous et réoccupa un laboratoire. Avec le D<sup>r</sup> P.-J. Petit, il publia (1929) son grand ouvrage sur le trachome, dont il avait commencé l'étude en 1901, au cours d'une mission en Égypte que lui avait confiée le Ministre de l'Instruction publique. Il devint membre de l'Assemblée de l'Institut Pasteur en 1929 et fut élu à l'Académie de Médecine

en 1930. L'Académie des Sciences lui décerna le prix Chaussier (1931) en récompense de ses travaux.

En 1931, Calmette l'accueillit dans le service de la tuberculose qu'il venait de fonder et depuis lors, sans négliger ses recherches sur le trachome, sur les affections microbiennes de l'œil et de la conjonctive, Morax se consacra à l'étude expérimentale des tuberculoses oculaires avec la collaboration fidèle et dévouée de son assistant le D<sup>r</sup> Nida. Par une douloureuse coïncidence, les *Annales* publient aujourd'hui même, immédiatement après cette notice, le mémoire qu'il venait de terminer avec le D<sup>r</sup> Rist.

V. Morax fut un grand bactériologiste et un grand médecin. Il a été aussi pour nous, dans cette Maison qu'il aimait à l'égal de son foyer, un Maître d'une bienveillance inépuisable et l'ami le plus cher. Avec une rare simplicité, il savait allier la sévérité de la science, la rigueur de la recherche et la plus généreuse bonté. On allait à lui comme vers un frère, en toute confiance, assuré de son accueil cordial, de sa droiture et du désintéressement absolu de ses conseils.

Nul plus que Morax n'a touché le cœur de ses compagnons de travail; nul n'a pénétré plus avant dans l'intimité de leurs pensées. Sa mort nous frappe de stupeur et notre douleur unanime s'ajoute à la douleur des siens, comme notre amitié s'ajoutait à leur affection.



## L'INFECTION TUBERCULEUSE PRIMITIVE DE LA CONJONCTIVE CHEZ L'HOMME

par V. MORAX et E. RIST.

Les phthisiologues ont étudié avec grand soin l'évolution de la primo-infection tuberculeuse pulmonaire, chez l'enfant vivant dans les centres urbains civilisés et chez l'adulte appartenant à des peuplades sauvages se contaminant au contact des civilisés. Malgré les précisions de plus en plus grandes que nous donnent à ce point de vue les examens radiologiques faits en série, il subsiste encore bien des obscurités sur le processus de guérison, si souvent constaté, de ces lésions. Il est donc fort instructif de suivre, par comparaison, l'évolution d'infections tuberculeuses primitives qui, du fait de leur localisation, restent pour ainsi dire constamment sous le contrôle de la vue. Ce sont les primo-inoculations ayant pour porte d'entrée le prépuce, la peau ou la conjonctive. On trouve de chacun de ces modes d'infection un certain nombre d'exemples dans la littérature.

Les primo-inoculations préputiales sont peut-être les mieux connues. Devenues très rares aujourd'hui, elles étaient encore fréquentes au début de ce siècle dans des communautés juives, où la circoncision rituelle des nouveau-nés mâles se pratiquait conformément à la vieille coutume, le sacrificateur suçait avec sa bouche la plaie préputiale pour arrêter l'hémorragie. Si l'opérateur était un tuberculeux crachant des bacilles, l'infection de l'enfant avait toutes les chances de se produire. Toute une série de publications sur des cas de circoncision contaminante s'échelonnent entre les années 1880 et 1893 (Hofmohl, V. Bergmann, Mayer, Eve, Lowenstein, Gescheit, etc.). Elsenberg décrit 4 cas de tuberculose primitive du gland suivie de tuberculose généralisée et dus au même opérateur, expectorant des bacilles. Lindemann décrit 2 cas, également dus à un même opérateur qui mourut tuberculeux deux mois après avoir cir-

concis les enfants dont l'un mourut et l'autre guérit. Lehmann donne 10 cas provenant d'une même source. Kolzow (1) en 1891 publia 7 cas, dont 2 mortels, 2 incomplètement guéris, 1 guéri, 2 perdus de vue. Son travail publié dans les comptes rendus de la Société russe pour l'hygiène nationale eut pour résultat de provoquer la réunion à Saint-Petersbourg d'une Commission qui réforma le rituel de la circoncision et interdit la succion (2). Depuis cette époque, la primo-inoculation préputiale est devenue plus rare. Le travail d'ensemble le plus important sur cette question est celui de E. Wolff (3) paru en 1921. Sa statistique porte sur 58 enfants inoculés par circoncision dans les premiers mois de leur existence : 46 d'entre eux ont été observés jusqu'à la fin de la première année. Au bout de douze mois, 27 enfants étaient encore vivants, 19 avaient succombé, 8 autres purent être observés jusqu'à l'âge de six ans : 5 étaient encore vivants à cet âge, 3 étaient morts. Si l'on s'en tient aux cas observés pendant un an, la mortalité est donc de 41,3 p. 100.

Les événements se suivent toujours dans l'ordre suivant : incubation de dix jours environ, au bout desquels apparaissent de la rougeur et du gonflement de la verge, une ulcération qui s'étend ; et peu après on voit se produire une volumineuse adénopathie inguinale. La guérison, quand elle survient, est longue à s'achever. La mort est le résultat d'une généralisation tuberculeuse, avec transformation caséuse des ganglions inguinaux, pelviens, mésentériques, et tuberculose miliaire des poumons, de la rate et des ganglions trachéo-bronchiques et cervicaux. A lire les protocoles d'autopsie, on songe aussitôt aux lésions constatées chez le cobaye, inoculé de tuberculose sous la peau et faisant, dans les délais normaux, une tuberculose généralisée succédant à un chancre avec adénopathie.

La primo-inoculation par la voie cutanée est moins bien connue. Il en existe un certain nombre d'exemples dans la

(1) KOLZOW, A propos de la contamination tuberculeuse des enfants juifs au cours de la circoncision. *Revue de la Société russe pour l'hygiène nationale*, 1891.

(2) ARLUCK et WINOCOUFF, Zur Frage über die Ansteckung an Tuberkulose jüdischer Kinder während der Beschneidung. *Beitr. z. Klinik der Tuberkulose*, 32, 1912, p. 341-349. Ce travail contient un cas suivi d'autopsie.

(3) E. WOLFF, Ueber Zirkumzisionstuberculose, *Berl. Klin. Wochenschr.*, n° 52, 26 décembre 1921.



littérature. Ils ne sont pas tous également probants. Ceux qui concernent des adultes et qui ont été publiés comme des faits d'infection primaire doivent vraisemblablement être rejetés pour la plupart. On a cité aussi des tuberculoses verruqueuses de la peau que l'on a considérées comme primitives, ce qui paraît fort sujet à caution. De même on trouve encore mention de tubercules anatomiques auxquels on attribue l'origine d'infections tuberculeuses de l'adulte. On lit partout, par exemple, que Laennec est mort phtisique à la suite d'un tubercule anatomique dû à une inoculation au cours d'une autopsie. C'est une thèse insoutenable. Comme la tuberculose verruqueuse, le tubercule anatomique est une lésion allergique due à une réinoculation exogène chez un individu déjà infecté de tuberculose antérieurement.

MM. Léon Bernard, Marcel Lelong et Maurice Lamy ont publié en 1929 un cas très intéressant de chancre tuberculeux chez un nourrisson (1). Il siégeait au-devant de la poitrine et s'accompagnait d'une volumineuse adénopathie axillaire gauche. La cuti-réaction à la tuberculine d'abord négative quinze jours après l'apparition de l'ulcération, devint nettement positive une semaine plus tard. Le pus sécrété par l'ulcération contenait des bacilles tuberculeux. La contamination par la mère tuberculeuse était évidente. Cinq mois plus tard la lésion persistait encore et il n'y avait aucun signe de généralisation. A propos de ce cas, qui fut l'année d'après suivi de la publication d'un autre cas analogue rapidement terminé par une généralisation tuberculeuse mortelle (2), Léon Bernard et ses collaborateurs font une revue succincte des cas publiés. Ils constatent que la cicatrisation, toujours lente, mais complète et durable est possible, mais que l'éventualité d'une généralisation tuberculeuse est néanmoins extrêmement fréquente, l'enfant succombant alors que le chancre tuberculeux est encore en activité, comme dans la tuberculose expérimentale du cobaye. Mais, disent-ils, l'établissement d'une statistique

(1) LÉON BERNARD, MARCEL LELONG et MAURICE LAMY, Un cas de primo-infection tuberculeuse par voie cutanée chez le nourrisson. *Bull. et Mém. de la Soc. méd. des Hôp. de Paris*, 1929, p. 1356-1364 (avec un bon index bibliographique).

(2) LÉON BERNARD, M. LAMY et M<sup>lle</sup> P. GAUTHIER-VILLARS, Une nouvelle observation de tuberculose cutanée primitive. *Bull. et Mém. de la Soc. méd. des Hôp. de Paris*, 1930, p. 494-497.

est bien difficile, la plupart des observations étant inutilisables du fait que l'enfant a été suivi pendant trop peu de temps. Un troisième cas, suivi de guérison donna l'occasion à Léon Bernard et à ses collaborateurs de publier en 1931 un important mémoire sur la question, avec une bibliographie très complète à laquelle nous renvoyons le lecteur (1).

Par ailleurs, en 1930, un cas présenté par MM. J. Hallé et P. Garnier (2) à la Société de Pédiatrie, un autre rapporté à la même Société par MM. Jean Hutinel, Margeridon et M<sup>me</sup> Collin (3) et un troisième, en 1934, par M. Coffin (4) donnèrent lieu à deux discussions auxquelles prirent part plusieurs pédiatres, et au cours desquelles de nouvelles observations, dont 1 de M. J. Hallé (5), 2 de M. Lesné (6 et 7), 1 de M. Ribadeau-Dumas (8), 1 de M. Amsler (9), 1 de M. Tixier (10) et 1 de Buchanan et Cruikshank (11) furent évoquées. L'opinion unanime fut que le pronostic de la primo-infection tuberculeuse cutanée varie avec l'âge; il est sévère chez le nourrisson, souvent bénin dans la deuxième enfance. D'autre part compte doit être tenu de la richesse en bacilles de la souillure infectante, les contaminations pauci-bacillaires étant évidemment moins graves.

\*  
\* \* \*

L'histoire de la primo-inoculation tuberculeuse de la conjonctive oculaire est plus mal connue encore. Même dans des

(1) L. BERNARD, M. LELONG, M. LAMY et M<sup>lle</sup> GAUTHIER-VILLARS, La primo-infection tuberculeuse par inoculation cutanée. *Annales de Médecine*, 30, 1931, p. 401-420.

(2) J. HALLÉ et P. GARNIER, Chancre tuberculeux de la joue chez un nourrisson. *Soc. de Pédiatrie de Paris*, 29 avril 1930, p. 191-195.

(3) J. HUTINEL, MARGERIDON et M<sup>me</sup> COLLIN, Primo-inoculation cutanée et adénite suppurée inguinale bacillifère. *Soc. de Pédiatrie de Paris*, 17 juin 1930, p. 272-275.

(4) M. COFFIN, Primo-inoculation tuberculeuse cutanée et adénite satellite traitées chirurgicalement. *Soc. de Pédiatrie de Paris*, 20 novembre 1934, p. 535-539.

(5) J. HALLÉ. *Soc. de Pédiatrie de Paris*, 20 novembre 1934, p. 539.

(6) LESNÉ. *Soc. de Pédiatrie de Paris*, 17 juin 1930, p. 276.

(7) LESNÉ. *Soc. de Pédiatrie de Paris*, 20 novembre 1934, p. 540.

(8) RIBADEAU-DUMAS. *Soc. méd. des Hôp. de Paris*, 1929, p. 1363.

(9) R. AMSLER, Primo-infection tuberculeuse par voie cutanée avec chancre cutané. *Revue de la tuberculose*, 3<sup>e</sup> sér., 13, 1932, p. 1034-1038.

(10) L. TIXIER, *Soc. de Pédiatrie de Paris*, 20 novembre 1934, p. 540.

(11) J. BUCHANAN et J. NORMAN CRUIKSHANK, Accidental inoculation with bacillus tuberculosis in a child, *Glasgow medical Journal*, juin 1930.



travaux ou des revues générales modernes concernant la tuberculose oculaire, la distinction n'est souvent pas faite entre les formes primitives de la maladie et celles qui sont secondaires à une tuberculose primitive siégeant dans un autre organe, et en particulier dans le poumon, ou dans les ganglions médiastinaux. Certains ophtalmologistes, il n'y a pas bien longtemps encore, allaient jusqu'à nier la tuberculose oculaire primitive. « Primäre Augentuberkulose existiert wahrscheinlich nicht », écrivait B. Fleischer en 1908 (1). Pourtant dès cette époque les caractéristiques cliniques de cette primo-inoculation étaient connues de plusieurs, et l'accent était mis sur le symptôme constant, capital, devant toujours faire suspecter la nature tuberculeuse et primitive de la lésion, à savoir *l'adénopathie prétragienne*, le plus ordinairement volumineuse, parfois énorme, persistante et souvent suivie de l'atteinte d'autres foyers de la chaîne parotidienne ou cervicale. La tuberculisation secondaire de la conjonctive ne s'accompagne pas d'adénopathie. Le pronostic de la primo-infection passait pour sévère et l'on redoutait sa propagation au larynx et au poumon, ou encore l'envahissement des méninges par voie rétro-bulbaire. L'un de nous néanmoins (2), dans un ouvrage didactique publié en 1907, considérait déjà que ces lésions conjonctivales primitives qu'il décrivait et figurait étaient susceptibles de guérir plus fréquemment qu'on ne le supposait, même en l'absence de tout traitement local.

Mais l'on chercherait en vain dans la littérature ophtalmologique ou phtisiologique des renseignements statistiques permettant d'évaluer les risques de mort et les chances de guérison de cette affection, somme toute assez rarement observée et dont les cas bien étudiés sont plus rares encore et clairsemés dans des périodiques très divers. Elle offre pourtant un très grand intérêt à plusieurs points de vue. Il y a d'abord le problème pronostique qui mériterait d'être mieux éclairci et dont l'importance pratique saute aux yeux. D'autre part on peut se demander par quelles voies la tuberculose constituée par le

(1) B. FLEISCHER, Ueber tuberkulöse Erkrankungen des Auges. *Württemberg. med. Korrespondenzblatt*, n° 8, 1908.

(2) V. MORAX, Précis d'ophtalmologie, 1907, p. 156-159 (Masson et C<sup>ie</sup>, édit.).

complexe primaire : chancre conjonctival-adénopathie prétragienne, se propage ou peut se propager à d'autres organes. Enfin on sait que l'instillation d'une simple goutte de crachat bacillifère ou d'émulsion de culture à la surface de la conjonctive, chez le cobaye ou le lapin, réalise, *sans lésion locale au niveau de l'œil lui-même*, un mode d'infection naturelle dont la première manifestation apparente est l'engorgement des ganglions du cou. Le fait a été bien établi dès 1913 par Calmette, Guérin et Gryzez (1). Selon ces auteurs, l'infection ganglionnaire gagnerait peu à peu les ganglions trachéo-bronchiques, les poumons et les viscères abdominaux. Calmette pensait que la contagion humaine familiale s'exerce fréquemment par la même voie, et qu'elle est alors consécutive à la projection, par un tuberculeux toussueur, sur la conjonctive oculaire de sujets sains, de particules de salive riches en bacilles (2).

Il est évident que, pour apprécier la validité de cette hypothèse, il y aurait grand intérêt à pouvoir suivre cliniquement et radiologiquement l'évolution de l'infection tuberculeuse chez des enfants dont la primo-inoculation conjonctivale due à des bacilles en nombre suffisant a créé une lésion caractéristique *in situ*. Si une telle lésion est régulièrement suivie d'une tuberculisation des ganglions trachéo-bronchiques, la probabilité de primo-inoculations conjonctivales pauci-bacillaires occultes ne déterminant pas de lésion à la porte d'entrée, mais permettant néanmoins aux germes de gagner par l'intermédiaire du ganglion prétragien et de la chaîne ganglionnaire cervicale, les ganglions trachéo-bronchiques, serait renforcée.

Les données de l'anatomie normale ne sont pas, il faut l'avouer, très favorables à une telle propagation par la voie lymphatique. Le ganglion prétragien fait partie du groupe des ganglions parotidiens dont les vaisseaux efférents vont aux ganglions sous-sterno-mastoïdiens. De ceux-ci partent des vaisseaux efférents qui se réunissent de chaque côté en un tronc commun, le tronc jugulaire. Celui de gauche s'abouche dans le canal thoracique, celui de droite s'ouvre dans le confluent des veines jugulaires interne et sous-clavière soit directement,

(1) A. CALMETTE, L'infection bacillaire et la Tuberculose chez l'homme et chez les animaux, 3<sup>e</sup> édit., 1928, p. 321 (Masson, édit.).

(2) *Ibid.*, p. 174.



soit par l'intermédiaire de la grande veine lymphatique [Rouvière] (1). La voie lymphatique normale va donc par les relais ganglionnaires sus-mentionnés de la conjonctive et du ganglion prétragien à la veine cave supérieure ; et de cette étape, ce qui est venu de la conjonctive par la lymphe ne peut parvenir au poumon que par la voie sanguine, oreillette droite, ventricule droit, artère pulmonaire.

Pourtant plusieurs auteurs ont cherché des connexions lymphatiques entre les ganglions cervicaux et les ganglions trachéo-bronchiques. F. Weleminsky (2), en 1905, avait prétendu démontrer expérimentalement que les ganglions trachéo-bronchiques constituent le centre de l'appareil lymphatique et l'aboutissant de toutes les voies lymphatiques de l'organisme. Les recherches de Beitzke (3) apportèrent au contraire la démonstration qu'il n'existe pas de vaisseaux lymphatiques efférents conduisant des ganglions cervicaux aux ganglions trachéo-bronchiques. Hart (4), Most (5), Bartels (6) ont signalé, il est vrai, des troncs efférents des ganglions trachéo-bronchiques gagnant un ganglion sus-claviculaire tout près de l'abouchement dans la veine. Mais jamais ils n'ont pu infecter par voie rétrograde les troncs efférents aux ganglions trachéo-bronchiques à partir des voies lymphatiques cervicales ; la conclusion de tous ces auteurs, comme de Beitzke, est que, dans aucun cas, il n'y a d'anastomose directe entre le système lymphatique de la tête et du cou et les lymphatiques de la plèvre, du poumon et des bronches. Hovelacque (7), dans son mémoire classique sur les lymphatiques du poumon, dit aussi n'avoir jamais vu une telle communication, au cours de ses nombreuses injections du système lymphatique.

(1) ROUVIÈRE. *Anatomie humaine*, 1, p. 213-215.

(2) WELEMINSKY, Zur Pathogenese der Lungentuberkulose. Die Stellung der Bronchialdrüsen im Lymphgefäßsystem. *Berliner Klin. Wochenschr.*, vol. XLII, 1905, p. 743-746.

(3) H. BEITZKE, Ueber den Weg Tuberkelbazillen von der Mund- und Rachenhöhle zu den Lungen. *Virchows Arch.*, vol. CLXXXIV, 1906, p. 1-53.

(4) HART, Zur Frage der Genese der tuberkulösen Lungenphthise, *Deutsche Med. Wochenschr.*, n° 43, 1907, p. 1774-1778.

(5) MOST, Die Infektionswege der Tuberkulose. *Berl. Klin. Wochenschr.*, n° 8, 1908.

(6) BARTELS, in Bardeleben, *Handbuch der Anatomie des Menschen*.

(7) A. HOVELACQUE, Lymphatiques du poumon, vaisseaux et ganglions. *Bibliographie anatomique*, fasc. 5, 22, p. 265.

Les recherches que nous venons de mentionner concernent l'homme. Pour l'anatomie de l'appareil lymphatique du cobaye, le travail le plus récent est celui de Krause (1). On y trouve ce passage qui résume une investigation approfondie : « Les ganglions trachéo-bronchiques ne drainent que les poumons et le cœur, cela est hors de toute contestation : ils ne reçoivent pas de vaisseaux provenant des ganglions cervicaux profonds et ne peuvent recevoir, par conséquent, de lymphé s'écoulant de la tête et du cou... Pour autant qu'on en peut juger, il n'existe même pas, chez le cobaye, de communication efférente des ganglions trachéo-bronchiques vers les ganglions cervicaux profonds, comme cela a été décrit chez d'autres animaux et chez l'homme. » Ces derniers mots se réfèrent aux descriptions ci-dessus signalées de Hart, de Most et de Bartels. Il semble donc bien que chez le cobaye inoculé par instillation conjonctivale, le cheminement des bacilles par la voie lymphatique trouve son terme à l'abouchement des lymphatiques cervicaux profonds dans la veine jugulaire, et que la tuberculisation des poumons se fasse à partir de ce point par la voie sanguine.

\*  
\* \*

Nous avons observé nous-mêmes un assez grand nombre de cas de tuberculose primitive de la conjonctive ; ils ont été le point de départ de la présente étude. Mais nous n'avons voulu retenir, pour en faire état dans la discussion des divers problèmes soulevés par cette forme de primo-inoculation tuberculeuse, que ceux dont l'observation a été suffisamment prolongée pour que l'on puisse connaître l'évolution ultérieure de l'infection. Les voici :

OBSERVATION I. — Jeanne J..., quinze ans, nous est conduite par sa mère à l'hôpital Lariboisière, le 23 mars 1916. C'est une fille fortement charpentée et d'aspect vigoureux, qui a signalé à ses parents, vers le 12 mars, une tuméfaction de la région pré-auriculaire gauche légèrement douloureuse et accompagnant une hyperémie conjonctivale avec sécrétion. Ces symptômes ont augmenté les jours suivants. On constate un certain degré d'œdème des paupières, de larmoiement et une sécrétion peu abondante.

(1) ALLEN K. KRAUSE, Tuberculosis in the guinea-pig, after subcutaneous infection, with particular reference to the tracheo-bronchial lymph-nodes. *The American Review of Tuberculosis*, 4, 1920, p. 135-191.



En retournant les paupières, les culs-de-sac apparaissent fortement hyperémiés et infiltrés de gros follicules. La conjonctive bulbaire ne participe que faiblement à l'hyperémie. On découvre avec peine une petite ulcération allongée dans le cul-de-sac inférieur, dissimulée entre les follicules. Le ganglion pré-auriculaire est assez volumineux et la peau qui le recouvre a une teinte érythémateuse. La pression provoque un peu de sensibilité. Vers le 5 avril, la fluctuation se manifeste nettement et la ponction faite avec la seringue de verre ramène un pus grisâtre. Des frottis faits avec ce pus montrent des bacilles acido-résistants assez abondants.

Le traitement local de la conjonctive a consisté en cautérisations au galvanocautère et en applications de pommade au xéroforme.

Le 8 août 1916, la conjonctive de l'œil gauche ne montre plus que quelques marbrures cicatricielles en rapport avec les cautérisations au galvanocautère. La peau de la région prétragienne est encore érythémateuse, mais dans un territoire plus circonscrit. La fistule ne donne plus lieu qu'à la formation d'une croûte.

Le ganglion sous-maxillaire qui avait suppuré et s'était fistulisé au cours du mois de juillet est en voie de guérison.

L'état général est satisfaisant. La jeune fille a bon appétit et a engraisé.

Nous avons eu l'occasion de la revoir en juin 1917, un peu plus d'un an après le début de son infection tuberculeuse. La conjonctive ne présente plus de lésions en dehors de légères cicatrices. Les trajets fistuleux sont fermés; les cicatrices sont souples. À la palpation, on ne reconnaît plus de ganglions hypertrophiés. L'état général demeure parfait et le poids a augmenté de 6 kilogrammes.

L'enquête que nous avons faite, pour tâcher de découvrir l'origine de cette contamination, nous a appris les faits suivants :

La famille, qui se compose de la mère et de deux filles, a été évacuée du Nord et s'est installée dans un petit logement avec une bonne qui est dans la famille depuis dix ans et qui, depuis un an, a présenté des lésions de tuberculose pulmonaire. Au mois d'août 1916, on considère qu'elle est dans un état des plus graves.

Des deux filles, l'aînée est celle dont nous avons relaté l'histoire, la cadette a présenté, depuis 1916, des lésions de tuberculose pulmonaire qui se sont compliquées de phénomènes méningés et ont entraîné la mort en mars 1917.

Il semble très vraisemblable que l'origine ancillaire de l'infection tuberculeuse a été la même pour les deux enfants, mais la porte d'entrée a été différente. Nous n'oserons pas en conclure que la tuberculose relativement bénigne de Jeanne est la conséquence de la pénétration primitivement conjonctivale.

OBS. II. — Lucette ..., dix mois, est adressée au Dr Morax par le Dr Chaillous, le 25 juillet 1932, pour une ulcération de la conjonctive de l'œil droit avec adénite pré-auriculaire dont l'étiologie tuberculeuse a été établie par inoculation au cobaye d'une biopsie conjonctivale. Le Dr Chaillous demande que soit précisée la nature, humaine ou non, du bacille en cause. Il communique les renseignements suivants : l'enfant a été présentée à la clinique

des Quinze-Vingts, le 18 juin 1932, pour des troubles qui, au dire des parents, avaient débuté vers la fin de mai. La mère avait remarqué à ce moment que l'œil droit était légèrement hyperémié et larmoyant et, dès le lendemain, elle avait été frappée par l'apparition d'une tuméfaction de la région pré-auriculaire du côté droit. L'état ne s'est pas modifié depuis lors, si ce n'est qu'au niveau de l'adénite pré-auriculaire, la peau a pris une teinte violacée.

La paupière supérieure est légèrement tuméfiée, avec abaissement du bord libre. En retournant cette paupière, on constate, à cheval sur la région tarsienne et le cul-de-sac supérieur, une ulcération ovale à bords nets à surface grisâtre, légèrement saignante, entourée d'une muqueuse hyperémiée et épaissie. L'ulcération mesure 1 centimètre dans le sens horizontal et 5 millimètres dans le sens vertical. Autour d'elle et dans l'épaisseur de la muqueuse, on constate la présence de petits points blancs non saillants. La conjonctive bulbaire est normale. Il n'y a aucun trouble de la cornée. La conjonctive du cul-de-sac inférieur est hyperémiée sans ulcérations. La peau de la région prétragienne est violacée et l'on perçoit une fluctuation nette. Les ganglions sous-maxillaires ou cervicaux ne sont pas perceptibles à la palpation.

De l'enquête familiale, il résultait que les parents étaient en bonne santé et avaient eu 4 enfants.

Un fils mort à neuf ans de tuberculose intestinale.

Une fille de huit ans en bonne santé.

Une fille de cinq ans en bonne santé.

Lucette, notre malade.

Le grand-père paternel, âgé de soixante-dix-huit ans, est atteint de bronchite chronique et vivait avec ses enfants et petits-enfants, s'occupant beaucoup de Lucette qu'il prenait dans ses bras. Depuis un mois seulement, l'état du grand-père ayant empiré, on l'a séparé des enfants. Le médecin de la famille n'a pas eu l'occasion de l'examiner, si ce n'est au cours de sa dernière maladie. Il n'a pas constaté, à l'auscultation, de symptômes caractéristiques, mais l'examen des crachats n'a pas été fait.

Lucette est née à terme. Les deuxième, cinquième, sixième jours après la naissance, la sage-femme lui a fait ingérer trois doses de BCG.

L'enfant s'est élevée normalement, jusqu'au moment où elle a présenté les troubles conjonctivaux.

Le 23 juillet, il a été fait aux Quinze-Vingts une cautérisation au galvano-cautère de la surface ulcérée.

Le 25 juillet, on pratique, à l'Institut Pasteur, les examens ci-dessous :

Frottis faits avec le produit de grattage de l'ulcération conjonctivale : pas de bacilles acido-résistants.

Frottis faits avec le pus de ponction du ganglion préauriculaire : bacilles acido-résistants assez nombreux (deux par champ).

L'ensemencement du produit de grattage sur quatre tubes de Lœwenstein placés à l'étuve à 38° n'a pas donné de colonies de bacilles de Koch.

L'ensemencement du pus ganglionnaire sur 6 tubes de Lœwenstein a donné, dans un seul tube, des colonies visibles deux mois après l'ensemencement.

Le pus ganglionnaire a été injecté sous la peau de 2 cobayes. L'un de 430 grammes a présenté une ulcération cutanée et une adénite inguinale. Il est mort de tuberculose viscérale généralisée le 2 novembre 1933, un peu plus de trois mois après l'inoculation.



L'autre, de 470 grammes, a présenté les mêmes lésions locales et est mort de tuberculose généralisée le 10 novembre 1932.

La culture sur Lœwenstein a été repiquée sur pomme de terre. Avec la culture d'un mois, on fait une émulsion à 1/10.000 de milligramme, dont 1 centicube est injecté dans la veine auriculaire d'un lapin de 2 kilogr. 600. Une autre émulsion à 1/100 est injectée à 1 lapin de 2 kilogr. 100. Ces 2 lapins sont encore vivants plus d'un an après l'injection.

Avec cette même émulsion à 1/10.000, on inocule sous la peau 2 cobayes : l'un de 360 grammes, présente une ulcération cutanée et une adénite et meurt en cinq mois avec une tuberculose généralisée ; l'autre, de 430 grammes, présente les mêmes lésions locales et meurt en cinq mois et onze jours de tuberculose viscérale généralisée.

On peut donc considérer cette tuberculose comme une tuberculose du type humain peu virulent.

Revenons maintenant à l'observation clinique de Lucette.

Le 27 août, la mère nous écrit que l'adénite suppurée préauriculaire s'est ouverte spontanément et que l'abcès s'est évacué.

Le 28 septembre, le Dr Chaillous réexamine l'enfant et constate que les lésions conjonctivales ont, pour ainsi dire, complètement disparu, mais que la tuméfaction préauriculaire persiste sans fistule. Il n'y a pas d'autres ganglions perceptibles.

Le 26 avril 1934, le Dr Delavierre, médecin de la famille depuis plus de sept ans, nous envoie les renseignements suivants : « La petite Lucette se porte actuellement à merveille. Il ne reste plus aucune trace de la lésion oculaire. La lésion cutanée préauriculaire est elle-même parfaitement guérie. L'état général de l'enfant semble excellent depuis plus d'un an.

Chez cette petite malade, contaminée à l'âge de huit mois, l'infection tuberculeuse a donné lieu à une ulcération de la conjonctive de l'œil droit suivie d'adénite préauriculaire. Ces lésions locales ont évolué en quelques mois pour se terminer par la guérison complète sans propagation apparente à d'autres ganglions, ou à d'autres tissus pendant la durée de l'observation qui s'étend sur une période de vingt-trois mois.

OBS. III. — Christiane D..., âgée de douze ans, est adressée au Dr Morax, le 18 février 1932, par le Dr Bollack, pour une lésion conjonctivale de l'œil droit avec adénite préauriculaire et sous-maxillaire qui s'était développée depuis sept mois.

Le 15 juillet 1931, l'enfant s'est réveillée avec une légère tuméfaction de la paupière supérieure. A une consultation publique où elle fut conduite, on suppose une piqûre de moustique. Quelques jours après, comme il existait une tuméfaction des ganglions préauriculaires et sous-maxillaires, on la présente dans un autre hôpital où le diagnostic d'oreillons fut envisagé. Le médecin de famille soigna l'enfant chez elle jusqu'à la fin d'août. A cette époque, elle fut envoyée à une troisième consultation ophtalmologique où l'on inocula 1 cobaye avec la lésion conjonctivale. Le diagnostic fut alors fixé, le cobaye s'étant tuberculisé.

La tuméfaction palpébrale et ganglionnaire persistant, l'enfant est con-

duite, le 26 janvier 1932, à la consultation ophtalmologique de l'hôpital Cochin, chez le Dr Bollak, qui, en raison des lésions folliculaires du cul-de-sac supérieur et de la persistance des adénites, nous l'adresse à l'Institut Pasteur. La cuti-réaction a été fortement positive.

La fente palpébrale droite est un peu rétrécie: la paupière supérieure paraît légèrement épaissie, et, en retournant la paupière supérieure et en éversant le cul-de-sac supérieur, on voit, le long du tarse, de sa région moyenne jusqu'à la région caronculaire, une masse mamelonnée gris rosé, empiétant légèrement sur la conjonctive tarsienne et non sur la conjonctive bulbaire. Il n'y a nulle part de solution de continuité de la muqueuse. Sur la conjonctive du cul-de-sac inférieur, il y a un léger épaississement médian de la muqueuse avec un petit abcès caséux jaunâtre sous-épithélial. Le ganglion préauriculaire, très gros au début, d'après les indications des parents, n'avait plus que le volume d'un gros pois. Le ganglion sous-maxillaire droit avait le volume d'une noix. Les ganglions cervicaux voisins étaient perceptibles. Excision d'un lambeau de conjonctive au niveau du cul-de-sac supérieur pour examen histologique et inoculation.

L'examen histologique montre l'infiltration diffuse de la muqueuse avec des formations folliculaires au centre desquelles on voit des cellules géantes. Le cobaye de 350 grammes, inoculé le 18 février 1932, par insertion sous-cutanée abdominale, présente, dès le 7 avril, une ulcération cutanée et des ganglions inguinaux volumineux. Le cobaye est tué le 14 avril et les ganglions prélevés pour culture. Il n'y a pas de lésions pulmonaires ni hépatiques, mais la rate est hypertrophiée et présente des nodules tuberculeux. Le pus caséux des ganglions est riche en bacilles acido-résistants. Les tubes de milieu de Lœwenstein ensemencés le 14 avril montrent, le 4 juillet, de petites colonies sèches, légèrement saillantes, qui sont repiquées sur pomme de terre glycinée. Sur ce milieu, les colonies ont une pigmentation rosée assez marquée. M<sup>me</sup> de Grolier, qui a bien voulu identifier ce bacille, le considère, de par sa faible activité pour le lapin, comme un bacille tuberculeux du type humain de virulence faible (apparition tardive de la lésion locale chez le cobaye). L'ensemencement sur milieu de Lœwenstein du pus ganglionnaire du cobaye a donné un résultat positif dans 4 tubes sur 6. Les colonies repiquées sur pomme de terre ont donné une culture abondante. Les colonies présentent une pigmentation rosée.

▼ Il est probable qu'une ulcération a existé au début; mais, sept mois après, lorsque nous avons vu la petite malade, il n'existait plus que cet état folliculaire que j'ai signalé.

Christiane a été suivie par le Dr Ameuille et a été traitée par les sels d'or à partir du 27 janvier 1932. Il lui a été fait trente-cinq injections. En juin 1932, le ganglion préauriculaire se sentait à peine à la palpation et l'état général était excellent; le Dr Ameuille continue à la surveiller tous les deux mois.

En février 1933, la fillette avait perdu 3 kilogrammes. Il n'y avait ni fièvre, ni perte d'appétit et l'examen radiographique du poumon était négatif.

En avril 1933, le ganglion sous-maxillaire droit se tuméfia, et, à la suite de ponctions, il se produisit un trajet fistuleux.

Le 13 novembre, le Dr Gérard Marchand pratiqua l'excision du ganglion.

Nous avons revu Christiane le 15 février 1934. Du côté de la conjonctive, on ne trouve plus qu'une petite surface lisse cicatricielle, correspondant au point d'excision de la conjonctive. La fente palpébrale s'ouvre normalement. Au niveau de l'incision cutanée faite pour l'excision du ganglion, la peau



présente une cicatrice souple et une très petite surface exulcérée recouverte d'une croûte. Il n'y a pas de ganglions perceptibles et l'état général paraît excellent.

Il s'est agi d'une tuberculose primitive de la conjonctive avec adénite préauriculaire, puis sous-maxillaire. Après une période de guérison apparente qui a duré un an, un nouveau foyer ganglionnaire est apparu qui est actuellement en voie de guérison complète, près de trois ans après le début de l'infection conjonctivale.

OBSERVATION IV. — M<sup>lle</sup> M..., dix-huit ans, sténo-dactylographe, est adressée le 2 juillet 1932 au Dr Morax par le Dr Méricot de Treigny, pour la confirmation du diagnostic de tuberculose conjonctivale primitive qu'il a posé. Les parents sont bien portants. Elle est fille unique et n'a jamais présenté de troubles de santé. Vers la fin de juin 1932, elle a remarqué que sa paupière supérieure droite était tuméfiée et que les ganglions préauriculaires et sous-maxillaires étaient tuméfiés et un peu douloureux; mais elle ne se rend à la consultation du Dr Méricot de Treigny que le 1<sup>er</sup> juillet parce que les paupières sont collées au réveil.

La fente palpébrale droite est un peu moins ouverte que la gauche.

La paupière supérieure est légèrement œdématisée. En retournant la paupière, on constate sur la conjonctive tarsienne et se prolongeant sur la conjonctive du cul-de-sac, une surface ulcérée irrégulière à contours polycycliques, entourée par une muqueuse légèrement épaissie et fortement hyperémiee.

Le ganglion préauriculaire droit est augmenté légèrement de volume, mais c'est surtout un ganglion prémaxillaire situé au voisinage de l'angle maxillaire inférieur qui a pris le volume d'un petit œuf et présente une fluctuation nette. Pas d'élévation thermique. Bon état général. Poids 49 kilogrammes.

En raclant la surface ulcérée de la conjonctive, on peut faire quelques frottis dans lesquels on décèle après une recherche prolongée de rares bacilles acido-résistants. On prélève de petits lambeaux de muqueuse sur les bords de l'ulcération, puis on inocule 3 cobayes sous la peau de l'abdomen et 1 lapin dans la chambre antérieure. Chez les 3 cobayes, l'ulcération cutanée et l'adénite sont manifestes au vingtième jour et la mort survient dans les trois mois.

Chez le lapin, des signes d'iritis nodulaires sont apparus le vingt-neuvième jour et la mort n'est survenue qu'après sept mois avec une tuberculose pulmonaire très discrète confirmée par la recherche des bacilles acido-résistants.

Lesensemencements de l'exsudat de l'ulcère sur milieu de Lœwenstein et sur pomme de terre glycinée répétés sur de nombreux tubes et à différentes reprises ont tous été négatifs.

Sur le conseil du Dr Calmette, la malade a fait régulièrement des instillations dans l'œil droit d'antigène méthylique et aucun autre traitement n'a été institué pendant trois mois. Pendant cette période, les lésions locales ne se sont pas modifiées d'une manière très accusée, l'hyperémie conjonctivale et la sécrétion ont un peu diminué. Vers le 22 juillet, on a vu au niveau du

limbe à XII apparaît une petite zone de vascularisation empiétant légèrement sur la cornée et ressemblant à un pannus au début.

A partir du mois d'octobre, les instillations ont été remplacées par des injections sous-cutanées d'antigène méthylique à raison de deux injections par semaine. J'ai pu suivre très régulièrement cette malade pendant deux ans et je puis dire jusqu'à sa guérison complète; je ne signalerai que l'évolution des principaux symptômes.

Le ganglion prémaxillaire fait à partir du 25 septembre une saillie très marquée, une ponction ramène du pus épais renfermant de nombreux bacilles acido-résistants. Le 1<sup>er</sup> octobre, la peau au niveau du ganglion prend une coloration violacée, puis s'infiltre en donnant lieu à un aspect chéloïdien qui ne s'efface progressivement qu'au cours de l'année 1933. Le 1<sup>er</sup> février 1933, le ganglion préauriculaire a le volume d'une lentille, le ganglion prémaxillaire, le volume d'une amande. Par contre, un ganglion situé entre la trachée et le sterno-cléido-mastoidien forme une saillie du volume d'une noix. Il augmente un peu les mois suivants et s'ouvre spontanément le 8 mai et à partir de ce moment, la régression de l'adénite se poursuit régulièrement. En février 1934, il ne reste au niveau du cou qu'une cicatrice légère, souple et de teinte rosée. On ne sent plus à la palpation aucune adénite.

Du côté de la conjonctive et du limbe, les lésions se sont cicatrisées progressivement. Le 1<sup>er</sup> décembre 1932, la lésion cornéenne n'apparaît plus que comme une très légère opacité cicatricielle traversée par quelques fins vaisseaux. L'ulcération conjonctivale s'est comblée et il ne persiste que quelques petites zones jaunâtres cicatricielles de la conjonctive tarsienne.

Le 31 mai 1933, le Dr Saenz a pratiqué une hémoculture qui est restée négative. L'inoculation du sang veineux à 4 cobayes ne les a pas tuberculisés. D'autre part, le Dr Valtis a bien voulu faire un examen des poumons à l'écran, il n'a décelé aucune modification pathologique du côté des poumons et des ganglions trachéo-bronchiques.

L'état général reste excellent. Poids, 55 kilogrammes.

Le 9 février 1934, les seuls symptômes persistants consistent dans une légère diminution de l'ouverture de la fente palpébrale droite, dans les vestiges cicatriciels sur la conjonctive tarsienne, d'autre part, dans les lésions cicatricielles cutanées au niveau des ganglions prémaxillaires et sterno-cléido-mastoidiens.

Le 26 octobre 1934, l'état général et local ne s'est pas modifié. Il n'y a pas de ganglions perceptibles.

Il s'est agi dans ce cas d'une primo-infection de la conjonctive par un bacille du type humain, qui s'est terminée par la guérison complète sans autre traitement local que les instillations d'antigène méthylique suivies d'injections sous-cutanées du même antigène, et cela pendant un an.

OBSERVATION V. — Madeleine L..., âgée de six ans, est présentée au Dr Morax à l'hôpital Lariboisière, le 25 janvier 1928, pour une conjonctivite de l'œil droit avec adénopathie préauriculaire. Fille unique de parents bien portants, elle est l'objet d'une surveillance très attentive. Elle n'a d'ailleurs jamais été malade jusque vers le 25 décembre 1927. Vers cette date, les parents ont remarqué un peu d'hyperémie conjonctivale et l'agglutinement des paupières



au réveil; mais Madeleine ne se plaignait pas. Quinze jours plus tard, on remarque la tuméfaction préauriculaire droite qui a un peu augmenté depuis lors.

Lorsque nous l'examinons le 25 janvier, nous constatons une légère tuméfaction des paupières avec réduction de la fente palpébrale droite. En renversant la paupière inférieure, on voit sur la conjonctive du cul-de-sac inférieur et au voisinage de la commissure externe, une petite ulcération linéaire. La muqueuse qui l'entoure est épaissie, hyperémisée avec des formations folliculaires et quelques petits points jaunâtres. La paupière a conservé sa souplesse. La conjonctive bulbaire n'est que faiblement hyperémisée.

Le ganglion préauriculaire droit soulève notablement la peau dont la coloration n'est pas modifiée. On sent sa fluctuation et la pression est un peu douloureuse. Les ganglions cervicaux ne sont pas augmentés de volume.

L'examen général montre au niveau des membres inférieurs et en assez grand nombre, des plaques d'*érythème noueux*, contemporaines de l'adéno-pathie.

Avec le produit de raclage de l'ulcération conjonctivale, il a été fait des frottis qui ont montré la présence de bacilles acido-résistants. L'inoculation d'une biopsie conjonctivale à un cobaye pratiquée le 7 février 1928 a donné lieu à un abcès sous-cutané qui s'ulcère et s'accompagne d'adénite. Les frottis faits avec le raclage de l'ulcère montrent des bacilles tuberculeux en grand nombre.

11 février, les nodosités des membres inférieurs se sont affaïssées, laissant une légère teinte brune et une fine desquamation centrale.

Les lésions conjonctivales persistent, mais l'hyperémie est moins accusée.

28 février, l'ulcération conjonctivale persiste; la muqueuse qui l'entoure présente un développement folliculaire plus accusé, mais sans ulcérations nouvelles. La peau de la région prétragienne soulevée par l'adénite est plus hyperémisée.

6 mars, ponction du ganglion préauriculaire: pus grisâtre épais. Sur frottis, nombreux bacilles acido-résistants.

Madeleine avait été adressée au Dr Rist, le 31 janvier 1928. Le cliché radiographique de son thorax ne montre rien d'anormal.

De l'enquête faite dans sa famille, il résulte qu'aucun de ses membres n'est tuberculeux et n'a pu la contaminer. Les parents sont parfaitement sains. D'autre part, on avait signalé qu'à l'école, la petite Madeleine était en contact avec une fillette toussieuse et qui avait la fâcheuse habitude de tousser dans la figure de ses camarades. Il nous a été possible d'examiner cette fillette qui est parfaitement bien portante. L'origine de la contamination est donc demeurée inconnue.

17 avril 1928. La symétrie des fentes palpébrales est devenue presque parfaite. La sécrétion conjonctivale légère a disparu.

Le ganglion préauriculaire a été ponctionné et traité par l'éther iodoformé. La tuméfaction a presque disparu. Il reste encore un trajet fistuleux donnant peu de sécrétion.

29 octobre 1928. L'aspect extérieur des paupières est parfaitement symétrique. La conjonctive du cul-de-sac inférieur a un aspect normal. Au cul-de-sac supérieur, on constate encore quelques petits follicules. Le ganglion préauriculaire n'est plus perceptible et la cicatrice cutanée est très peu apparente. Madeleine revient de Berck où elle a passé quatre mois et pendant lesquels elle a augmenté de 1 kilogramme.

La santé générale est demeurée excellente, néanmoins, le séjour à la mer

ayant été favorable, les parents ont renvoyé leur fille à Berck, d'où elle est revenue fin juin 1929. En juillet, elle eut la scarlatine pendant son séjour à Paris. Au cours de la maladie, l'adénite préauriculaire reparut et la fistule a recommencé à sécréter très abondamment. Après guérison de la scarlatine, Madeleine repartit pour Berck et ne rentra définitivement à Paris que fin septembre 1931.

Nous avons pu l'examiner à nouveau avec le Dr Rist, le 22 février 1934. C'est une belle fillette, bien développée, du poids de 34 kilogr. 500 et qui se porte très bien. La conjonctive a repris son aspect normal. La peau de la région prétragienne montre une cicatrice souple, légèrement irrégulière, non saillante, sans adénite sous-jacente. Les ganglions cervicaux ou autres ne sont pas perceptibles. La respiration est normale. La radiographie des poumons et du cou montre un aspect absolument normal.

Depuis le réveil de l'infection tuberculeuse ganglionnaire au cours de la scarlatine en 1929, soit un an après le début de l'infection tuberculeuse, aucune manifestation nouvelle de cette infection ne s'est produite et après six ans, s'il ne persistait la cicatrice prétragienne, aucun symptôme ne permettrait de supposer que Madeleine a été contaminée par le bacille tuberculeux. Une particularité intéressante de ce cas est l'éruption typique d'érythème noueux qui s'est produite en même temps que l'adénopathie prétragienne. La biopsie d'un des placards d'érythème a été faite, et un fragment inoculé à deux cobayes ne les a pas tuberculisés.

La malade, qui fait l'objet de l'observation suivante, avait été étudiée depuis le mois de juin 1922, par l'un de nous au Dispensaire Léon Bourgeois et par le Dr J. Chaillous, à la Clinique nationale des Quinze-Vingts, et son histoire avait été publiée en janvier 1923, à la Société d'études scientifiques de la Tuberculose (1). Mais nous ne l'avions pas perdue de vue depuis et l'occasion nous a été donnée de l'examiner à nouveau en novembre 1933, puis en octobre 1934, c'est-à-dire plus de douze ans après le début. C'est pourquoi nous croyons intéressant de reproduire ici notre relation de 1923 en y ajoutant les notes prises ultérieurement.

OBSERVATION VI. — Madeleine D..., âgée de six ans, se portait parfaitement bien jusqu'au début de juin 1922; dernière née d'une famille de huit enfants, dont un seul, le troisième, est mort dix-huit ans auparavant (probablement de méningite cérébro-spinale) et dont tous les autres sont bien portants,

(1) E. RIST et J. CHAILLOUS, Un cas de tuberculose primitive de la conjonctive, *Revue de la Tuberculose*, 1923, p. 172-175.



elle vit à Nesle-la-Vallée (Seine-et-Oise) avec ses parents, eux aussi bien portants.

C'est le 13 juin 1922, que sa mère l'a conduite aux Quinze-Vingts pour une affection de l'œil gauche ayant paru quelques jours auparavant. La paupière supérieure gauche est tombante, très gonflée, la conjonctive bulbaire rouge, œdématisée, la sécrétion peu abondante. Il existe une adénopathie pré-auriculaire gauche très volumineuse; c'est une masse étalée en avant du tragus, noyée dans un œdème diffus et déformant la moitié gauche de la face de l'enfant. Le 27 juin, la saillie ganglionnaire s'étend jusqu'à l'angle de la mâchoire: Dans le cul-de-sac conjonctival externe, on constate de nombreux petits points blancs infiltrant la conjonctive épaissie. Le 1<sup>er</sup> juillet, on parvient à éverser la paupière et l'on constate dans le cul-de-sac une saillie en crête de coq de la conjonctive dont la surface est semée d'ulcérations de couleur blanc-jaunâtre, dont les bords et le fond sont très irréguliers.

A partir du 8 juillet, on fait, sous anesthésie locale, une douzaine de séances de galvano-puncture dans tout le tissu infiltré. Vers le milieu de septembre, ce tissu prend l'aspect cicatriciel et le ganglion prétragien a beaucoup diminué de volume, mais l'œdème périganglionnaire persiste. Le 10 octobre, le cul-de-sac conjonctival ne présente plus ni saillies, ni ulcérations. Mais le 7 novembre, on voit reparaitre dans la partie externe du cul-de-sac une petite ulcération à fond blanchâtre, que la galvano-puncture réduit et supprime peu après.

En janvier 1923, il persiste encore de la rougeur de la conjonctive palpébrale, mais la conjonctive bulbaire est normale. On peut sentir le ganglion prétragien dur, non douloureux; il n'est pas encore complètement débarrassé de son enveloppe œdémateuse.

C'est le 28 juin 1922 que l'enfant a été examinée pour la première fois au Dispensaire Léon-Bourgeois, au point de vue de sa santé générale d'une part et de l'état de ses organes respiratoires d'autre part. Ceux-ci se sont montrés parfaitement normaux. Ni les méthodes stéthacoustiques, ni les méthodes radiologiques ne nous ont fait découvrir dans le thorax de Madeleine D..., quoi que ce soit de pathologique. Cette intégrité s'est maintenue jusqu'ici. En dehors du ganglion prétragien gauche, nous n'avions constaté aucune autre adénopathie. L'enfant est restée à tous points de vue parfaitement bien portante, gaie, joueuse, ayant bon appétit et bon sommeil. Elle avait de juin à janvier augmenté de 2 kilogrammes.

L'aspect macroscopique de la lésion oculaire nous a dès le début fait penser à la tuberculose, et, après avoir discuté, pour l'écarter, l'opportunité d'une injection probatoire de tuberculine, nous avons préféré faire, le 1<sup>er</sup> juillet, une biopsie d'un fragment de conjonctive malade. Sur la coupe de la biopsie, on trouve des follicules tuberculeux avec caséification centrale et des bacilles tuberculeux. Un fragment de la biopsie a été inoculé à un cobaye qui a succombé, le 28 octobre, à une tuberculose généralisée.

D'autre part, la cuti-réaction faite le 29 juin, trois semaines après le début, s'est montrée très fortement positive, papuleuse, avec phlyctènes. Répétée le 2 novembre, elle a présenté à nouveau ce caractère phlycténulaire, témoignage d'une réactivité intense.

Evidemment, une cuti-réaction négative constatée avant l'apparition de la lésion oculaire, donnerait à notre thèse de l'accident initial un argument de plus, si celui que nous tirons de l'adénopathie n'était pas suffisant. Notons d'ailleurs que cette petite a été élevée à la campagne, que ses parents, que nous avons examinés, sont bien portants, qu'il n'y a aucun tousseur parmi

ses six frères et sœurs et qu'elle n'avait jamais été en contact avec aucun tousseur jusqu'à l'incident suivant, dont la mère nous a fait le récit circonstancié et qu'il nous paraît utile de rapporter dans tous ses détails :

La famille D... a hébergé dans sa maison de Nesle-la-Vallée, exactement du 1<sup>er</sup> au 31 mai 1922, une cousine âgée de vingt-trois ans, dont l'histoire est significative. Cette dame X..., habitant le Perreux, avait eu, en juillet 1921, un deuxième enfant qu'elle n'avait pas allaité parce que, déjà malade, toussant et expectorant. Vers février 1922, elle fait une hémoptysie. Son médecin conseille un départ à la montagne aux environs de Riom.

Mais estimant, suivant un préjugé trop répandu, qu'il pouvait être périlleux de passer brusquement du Perreux à l'altitude de 800 mètres, il conseille une étape intermédiaire d'un mois à la campagne aux environs de Paris. M<sup>me</sup> X... ne peut suggérer autre chose qu'un séjour chez ses cousins, à Nesle. Elle est néanmoins prise d'un scrupule à cause de la présence de nombreux enfants chez les D... et elle demande à son médecin si elle n'est pas contagieuse. Celui-ci — deuxième aberration — la rassure complètement à ce sujet. Voilà donc M<sup>me</sup> X... accueillie dans la famille D... Elle se prend d'affection pour la petite Madeleine D..., qui est très caressante et qu'elle embrasse constamment sur la bouche et le visage, alors qu'elle toussait et crachait du matin au soir. Une vague de chaleur sévissait sur la région parisienne au mois de mai de l'année 1922. M<sup>me</sup> D... affirme avoir vu, à plusieurs reprises, sa fillette en transpiration s'éponger avec le mouchoir de M<sup>me</sup> X... qui traînait toujours sur la table, la mode interdisant, comme on sait, les poches aux dames. Le 31 mai, M<sup>me</sup> X... quitte Nesle et se rend à Riom, d'où on ne tarde pas à l'envoyer à Pau où on lui fait un pneumothorax artificiel, et où, aux dernières nouvelles, elle est atteinte d'une forme galopante de tuberculose pulmonaire.

Vers le 5 juin, Madeleine D... a l'œil gauche un peu rouge. Le 8 juin, apparaît l'adénopathie que sa mère prend d'abord pour les oreillons. Le 11, on s'aperçoit que la conjonctive est rouge et parsemée de points blanchâtres. Le 13, on la conduit aux Quinze-Vingts.

Telle était l'histoire que nous avons publiée en janvier 1923. L'enfant a été revue au Dispensaire Léon-Bourgeois en février 1927. Elle était en très bonne santé. Une sœur, la cinquième enfant de la famille, était décédée en août 1926, de tuberculose pulmonaire après avoir séjourné deux mois au Sanatorium de Bligny. Ajoutons que l'un de nous (Dr Rist) avait eu l'occasion d'examiner *in extremis*, en 1923, la contaminatrice de la petite Madeleine, et l'avait trouvée atteinte d'une tuberculose pulmonaire bilatérale excavée, étendue, à laquelle elle succombait quelques jours après cet examen.

Le 23 octobre 1933, Madeleine D..., alors âgée de dix-sept ans, venait à nouveau consulter le Dr Rist. Elle avait une petite adénopathie angulo-maxillaire gauche, molle, non douloureuse, qui semblait exister depuis l'année 1928.

Elle avait été entre temps opérée deux fois de végétations adénoïdes. En mai 1933, elle avait eu les oreillons; l'adénopathie angulo-maxillaire aurait augmenté depuis. D'autre part, elle avait eu, en août 1933, de l'impétigo du visage; le Dr Ravaut, de l'hôpital Saint-Louis, l'avait traitée pour cette affection et avait conseillé un traitement radiothérapique du ganglion. A l'examen stéthacoustique et radiologique du thorax, on ne constatait rien d'anormal.

Le 6 octobre 1934, nous revoyions une dernière fois Madeleine D... Le Dr Portret avait fait, sur notre conseil, une douzaine de séances de radio-



thérapie sur l'adénopathie angulo-maxillaire. Il ne subsiste qu'un ganglion indolore, petit, tout juste palpable. Le ganglion prétragien n'est pas perceptible. Il n'existe aucun symptôme d'une affection des voies respiratoires. L'examen stéthacoustique et radioscopique du thorax ne révèle rien de pathologique. Un cliché radiographique, fait le même jour, donne une image normale. M<sup>lle</sup> D... a l'apparence d'une jeune fille florissante de santé.

Ici encore, la conjonctivite tuberculeuse de primo-inoculation a évolué vers une guérison locale que tout permet, après douze ans d'observation, de considérer comme complète et solide. Il n'y a eu de propagation ganglionnaire que très tardivement, cinq ans au moins après la primo-infection. Encore cette propagation n'a-t-elle atteint qu'un seul ganglion. Elle semble avoir été favorisée par une infection adénoïdienne banale, par un impétigo de la face, puis par les oreillons. Les poumons et l'appareil ganglionnaire trachéo-bronchique ont été toujours, macroscopiquement tout au moins et cliniquement, indemnes.

OBSERVATION VII. — L'un de nous a eu l'occasion d'examiner pour un choix de verres, une dame de quarante-cinq ans, fille d'un oculiste étranger qui lui raconta qu'à l'âge de vingt ans, elle avait été atteinte de tuberculose primitive de la conjonctive de l'œil gauche avec grosse adénite préauriculaire. L'ulcération conjonctivale siégeait au niveau du cul-de-sac supérieur. L'adénite préauriculaire s'est abcédée et il se produisit une fistule qui ne guérit qu'après huit mois.

Avec la lésion conjonctivale, on aurait inoculé un cobaye qui serait mort de tuberculose.

Elle fut traitée pendant plus de six mois par des injections de tuberculine, puis tout rentra dans l'ordre et depuis lors, c'est-à-dire depuis vingt-cinq ans, elle n'a présenté aucun trouble de santé, aucune manifestation pulmonaire ou autre.

La conjonctive du cul-de-sac ne présente aucune lésion cicatricielle manifeste. Par contre, au-devant de l'oreille gauche, au niveau du ganglion prétragien qui n'est d'ailleurs pas perceptible, on voit une petite cicatrice blanche et souple attestant la réalité de l'adénite fistulisée ancienne. Les ganglions sous-maxillaires et cervicaux ne sont pas perceptibles.

Il semble bien, dans ce cas, que l'on puisse parler d'une guérison définitive.

Voilà donc sept observations de tuberculose conjonctivale primitive qui se sont terminées par la guérison en apparence complète. Nous disons « en apparence », ce qui signifie que la porte d'entrée conjonctivale s'est cicatrisée, que l'adénite satellite et les lésions cutanées liées à la fistulisation ont disparu et qu'aucune localisation bacillaire viscérale ou autre n'est

apparue. Nous avons classé nos observations suivant la durée de la période d'observation après lésion primitive. Cette période s'est étendue suivant les cas de un à vingt-cinq ans. Nous nous garderons d'en conclure que le bacille tuberculeux a disparu complètement de l'organisme et que ces sujets sont définitivement à l'abri de toute manifestation tuberculeuse nouvelle. N'avons-nous pas vu, chez la petite Madeleine L... (obs. V), alors que l'état local paraissait absolument guéri, l'adénite préauriculaire se développer à nouveau et donner lieu à une suppuration et à une fistulisation nouvelles, et cela pendant le cours de la scarlatine? Il est vrai que cet incident, qui a d'ailleurs rapidement guéri, s'est produit un peu plus d'un an après l'infection conjonctivale primitive.

De même, chez Madeleine D... (obs. VI), une adénopathie angulo-maxillaire très vraisemblablement tuberculeuse s'est développée cinq ans après la conjonctivite tuberculeuse primitive gauche, qui s'était depuis longtemps complètement cicatrisée ainsi que son adénopathie prétragienne satellite. Cette nouvelle atteinte ganglionnaire, favorisée sans doute par des infections non tuberculeuses intercurrentes (adénoïdites, impétigo de la face, oreillons) a persisté plusieurs années; mais elle est restée isolée, ne s'est pas abcédée et a fini par guérir.

Dans aucun cas, il n'y a eu d'autres localisations tuberculeuses; l'appareil respiratoire intrathoracique (poumons, plèvre et ganglions) est toujours resté indemne. Le pronostic non seulement prochain, mais lointain de la tuberculose conjonctivale primitive, semble donc assez favorable.

La probabilité d'une propagation directe au poumon, par la voie lymphatique, d'une infection tuberculeuse ayant pour porte d'entrée la conjonctive oculaire semble assez difficile à défendre en présence d'observations telles que celles qui précèdent. Ce n'est pas pourtant qu'elle n'ait trouvé des partisans et que l'on n'ait apporté des arguments cliniques destinés à la soutenir. Mais ces arguments ne sont pas à l'abri de la critique. C'est ainsi que MM. L. Pellissier et Valtis ont rapporté en 1928 à la Société d'Études scientifiques sur la Tuberculose (1) l'histoire fort curieuse d'une femme âgée de vingt-huit ans qui présentait

(1) L. PELLISSIER et J. VALTIS, Un cas d'infection tuberculeuse humaine à porte d'entrée oculaire. *Revue de la Tuberculose*, 1929, p. 118-123.



sur toute la hauteur du cou, une chaîne de ganglions calcifiés, depuis le pré-auriculaire jusqu'aux sus-claviculaires et, à l'examen radiologique, une calcification juxta-aortique gauche avec un réseau de fines travées et quelques taches entre hile et clavicule. Il y avait aussi une tache dense à centre clair, de la grosseur d'un haricot, à la partie supérieure du hile droit. Ces altérations radiologiques n'avaient jamais eu de traduction clinique quelconque, et la femme qui les présentait avait toujours été bien portante du point de vue pulmonaire. Or, elle avait fait à l'âge de huit ans une chute qui avait déterminé une plaie de la paupière supérieure gauche ainsi que des lésions du globe oculaire lui-même. L'œil, injecté et douloureux, fut traité pendant plus de deux ans pour une prétendue « kérato-conjunctivite ». Une adénopathie pré-auriculaire s'était développée un mois après le début et persista plusieurs années. Il y avait autour de l'enfant les conditions d'une contagion tuberculeuse familiale.

A la même séance de la Société de la Tuberculose, M. Courcoux (1) présenta les clichés radiographiques d'une femme d'une cinquantaine d'années, bien portante, qui présentait une grande quantité de calcifications ganglionnaires cervicales bilatérales, allant de la région mastoïdienne aux régions sus-claviculaires et axillaires. Il y avait aussi des ganglions calcifiés au niveau des hiles pulmonaires. Cette femme avait deux ans auparavant soigné un de ses parents atteint d'un mal de Pott avec abcès ossifluent dans la région inguinale. Au cours d'un pansement, elle reçut du pus dans l'œil droit. Une réaction inflammatoire importante se produisit puis se calma. *Plusieurs semaines après* survinrent des adénopathies cervicales du même côté, de la fièvre et des troubles importants de l'état général qui firent penser d'abord à une fièvre typhoïde et finirent par guérir.

Dans le premier cas, il est probable qu'il s'est agi en effet d'une primo-infection conjonctivale chez une enfant de huit ans. Mais rien ne prouve que les légères altérations pulmonaires constatées vingt ans après aient été dues à la propagation de l'infection tuberculeuse par voie lymphatique. Il est bien plus plausible qu'elles aient été dues à une réinfection. Dans le cas

(1) COURCOUX, L'infection tuberculeuse par l'œil. *Revue de la Tuberculose*, 1929, p. 123-125.

de M. Courcoux, la primo-infection conjonctivale est très peu probable, s'agissant d'une femme de cinquante ans. D'ailleurs, là encore, rien ne démontre la continuité entre les adénopathies cervicales et les adénopathies trachéo-bronchiques. Celles-ci préexistaient peut-être bien à celles-là, et de toute manière il est bien hasardeux de préjuger ainsi, rétrospectivement, et à si grande distance dans le passé, de l'ordre de succession des événements.

D'autres fois, c'est un trop grand écart dans le temps entre la lésion oculaire (ou cutanée) et l'adénopathie satellite qui éveille le doute. Ainsi, l'une des observations plus haut citées de M. Lesné (1) concerne une enfant qui présenta à l'âge de huit mois une ulcération suppurante de la région cervicale inférieure gauche. Sept mois plus tard seulement, à quinze mois, apparut une adénite suppurée de la région cervicale moyenne. Sur un cliché radiographique du thorax, il y avait une volumineuse ombre hilaire et péri-hilaire droite. L'enfant avait du cornage. La nature primitive de l'ulcération cutanée ne peut guère être admise, et il est bien plus probable que l'inoculation première a été intrapulmonaire, juxta-médiastinale et que l'ulcération cutanée demeurée pendant sept mois sans réplique ganglionnaire a été secondaire.

Quoi qu'il en soit, dans aucun des 7 cas observés par nous, il n'y a eu d'atteinte pulmonaire ou ganglionnaire médiastinale. En revanche, il y a eu au moins une fois dissémination de bacilles tuberculeux par la voie sanguine : notre malade de l'observation V a fait presque en même temps que son adénopathie prétragienne une éruption d'érythème noueux caractéristique, ne se distinguant en rien des éruptions analogues que l'on a signalées ces dernières années de divers côtés comme survenant au cours des primo-infections tuberculeuses à localisation pulmonaire. Mais cet envahissement de la circulation sanguine a été passager, bénin, et n'a pas laissé de vestiges. C'est sans aucun doute par la voie sanguine, la seule qui, anatomiquement, soit ouverte, que se produit l'envahissement des poumons du cobaye inoculé de tuberculose par la conjonctive. Chez cet animal, comme l'ont montré Calmette, Guérin et

(1) LESNÉ. *Société de Pédiatrie de Paris*, 17 juin 1930, p. 276.

Gryzez, il suffit de déposer I goutte d'émulsion bacillaire sur la conjonctive non lésée pour provoquer la tuberculose des ganglions régionaux et secondairement la généralisation de l'infection.

Dans la race humaine, un tel mécanisme de contamination ne paraît guère admissible, puisque des tuberculoses primitives sévères de la conjonctive, et qui mettent plusieurs mois à guérir, ne déterminent pas de lésions pulmonaires. A plus forte raison est-il peu probable qu'une contamination conjonctivale assez pauci-bacillaire pour ne créer aucune lésion à sa porte d'entrée puisse être à l'origine d'une tuberculose pulmonaire.

Dans ceux de nos cas où la nature du virus tuberculeux a pu être précisée, il s'agissait de la variété humaine du bacille. Dans notre observation II, l'intérêt de cette détermination était d'autant plus grand que l'enfant avait reçu après sa naissance trois doses de BCG. Toute hypothèse tendant à rattacher l'infection oculaire au BCG pouvait donc être catégoriquement écartée.

On remarquera que l'âge de nos malades s'est échelonné de huit mois à vingt ans. Ce dernier âge est, pour les centres urbains, civilisés tout au moins, remarquablement tardif et à coup sûr exceptionnel.

Le pronostic de la tuberculose primitive de la conjonctive est, contrairement à l'opinion encore communément admise il y a quelques années, assez favorable. Ce n'est pas à dire qu'il ne puisse se produire des évolutions conduisant à la mort. Mais de l'observation longtemps poursuivie des malades dont l'histoire est rapportée dans ce travail, nous croyons pouvoir déduire que si nous avons été si peu renseignés jusqu'ici sur le comportement de cette forme de tuberculose, c'est qu'elle n'a pas d'ordinaire de suites fâcheuses et que, parmi les sujets guéris, beaucoup ne viennent pas réclamer de nouveaux examens cliniques.

Le contraste est grand entre la bénignité relative de la primo-inoculation conjonctivale et la sévérité extrême de la primo-inoculation préputiale. C'est que celle-ci, liée étiologiquement à la circoncision rituelle, n'atteint de ce fait que de très jeunes enfants, des nouveau-nés, tandis que le chancre tuberculeux de la conjonctive ne se produit guère que chez des enfants plus âgés. La gravité des accidents primitifs pulmonaires est, elle aussi, en raison inverse de l'âge. Cela est d'observation constante.



# ETUDES SUR L'ULTRAVIRUS TUBERCULEUX

(TROISIÈME MÉMOIRE)

## SUR LA CULTURE DES « PROTOGÈNES TUBERCULEUX »

par G. SANARELLI et A. ALESSANDRINI.

*(Institut d'Hygiène de l'Université de Rome.)*

### I. — Les ultrafiltres de collodion dans l'étude de l'ultravirus tuberculeux.

Dans notre second mémoire (1) sur l'ultravirus tuberculeux, nous avons démontré que, par l'emploi de sacs doubles de collodion, il est possible d'observer la germination et le développement des éléments ultrafiltrés et, par conséquent, invisibles du virus tuberculeux.

Nous avons également établi qu'on pouvait obtenir, sur des milieux nutritifs convenables, la culture des premières formes visibles, germées de ces éléments ultrafiltrés.

Nous avons donné aux premières phases, à peine visibles au microscope, de ces éléments néoformés, non acido-résistants et issus des éléments invisibles de l'ultravirus passés de la loge interne dans la loge externe des doubles sacs de collodion, le nom de « protogènes tuberculeux ».

Une technique originale de laboratoire, désormais bien connue et d'application facile, nous a donc permis de confirmer l'existence des inframicrobes dérivés du virus tuberculeux, d'une façon peut-être plus démonstrative que par l'emploi des bougies de Chamberland ou de Berkefeld.

L'usage de ces bougies semble, à première vue, beaucoup plus facile et expéditif. Malheureusement, maints auteurs qui les ont employées ont souvent négligé certains détails suggérés

(1) Etudes sur l'ultravirus tuberculeux. II<sup>e</sup> Mémoire. Ces *Annales*, 1933, p. 167.

par la pratique; pour ce motif, et aussi en raison des insuccès fréquents, leurs résultats expérimentaux ont laissé souvent à désirer, ouvrant ainsi la voie à des critiques sévères (1).

Jousset (2) a même, récemment, mis en doute la capacité filtrante des bougies Chamberland, généralement employées dans ce genre d'expériences. Selon cet auteur, à travers le filtre Chamberland L3, qui est le plus employé, passeraient non seulement les bacilles tuberculeux et certains éléments granuleux cyanophiles, capables de produire des lésions spécifiques chez le cobaye, mais aussi les très petits microbes du choléra des poules, que l'on ajoute d'ordinaire au matériel à filtrer, dans un but de contrôle. Ce serait à cause de filtrations imparfaites que l'on observerait, chez les cobayes inoculés avec des filtrats tuberculeux, les lésions spécifiques bien connues, sur la signification desquelles les opinions sont fort discordantes.

Mais ces remarques, sans doute exagérées, ne peuvent concerner nos sacs de collodion. Cela est d'autant plus vrai que Jousset lui-même ne semble contester ni l'existence de l'ultravirus tuberculeux, ni les résultats démonstratifs et probants obtenus par l'emploi des sacs de collodion. Bien plus, il suggère de contrôler par la méthode de ces sacs les expériences de filtration *in vitro* faites jusqu'à présent avec les bougies poreuses et dont les résultats auraient, dit-il, une valeur assez discutable.

Rappelons à ce propos que même Hauduroy (3) ne recommande plus, depuis longtemps, l'emploi des bougies de porcelaine dans les recherches scientifiques; il préconise, au contraire, l'ultrafiltration à travers les membranes de collodion, méthode plus sûre et plus constante.

En ce qui concerne les sacs de collodion, certains auteurs ont signalé de prétendus défauts, en particulier la fragilité de ces mêmes sacs. Mais dans nos deux précédents mémoires (4) nous avons démontré que ces défauts devaient être considérés comme tout à fait inexistantes.

(1) Perche non si è riusciti a porre sempre in evidenza l'ultravirus tuberculare. *Annali d'Igiene*, 1932, p. 1.

(2) Existe-t-il un ultravirus tuberculeux? *La Presse Médicale*, 18 août 1934, p. 1305.

(3) Les ultravirus et les formes filtrantes des microbes. Paris, 1926, p. 8 et 189.

(4) Ces *Annales*, 1932, p. 144 et 1933, p. 167.

Il est bien démontré, désormais, que les insuccès de certains auteurs qui ont expérimenté avec nos sacs de collodion (1) doivent être uniquement attribués à des imperfections dans la confection de ces sacs (2). Nous avons plusieurs fois insisté sur la nécessité de confectionner ces derniers avec une rigoureuse précision (3). Il est vrai que cette préparation exige un travail soigneux et des procédés manuels délicats. Mais quand elle a été convenablement effectuée, les sacs présentent de sérieuses garanties de résistance et de sûreté, que l'on peut facilement constater soit *in vitro*, soit *in vivo*.

Du reste, nombreux sont déjà les auteurs qui, depuis longtemps, ont observé que les sacs de collodion préparés avec soin, et introduits dans le péritoine d'animaux, peuvent y rester plusieurs mois de suite sans subir aucune altération.

Dans ces derniers temps, l'emploi de ces sacs pour la culture et l'étude *in vivo* du virus tuberculeux, ou d'autres germes pathogènes, s'est répandu dans les laboratoires, donnant des résultats satisfaisants. Les plus récentes expériences de Manfredi et Perrino (4), de Sabatucci (5), de Arloing et Dufourt (6), de Latteri (7), de A. et R. Sartory et J. Meyer (8), de J. Brancato (9), etc., ont démontré que notre technique des sacs a rendu les plus grands services à tous ceux qui ont su l'utiliser convenablement.

Par exemple, Arloing et Dufourt ont retrouvé les sacs de collodion, simples ou doubles, absolument intacts même

(1) J. FONSECA, *Terà o agente da Tuberculose uma forma filtravel?* *Arquivos do Instituto Bacter. Camara Pestana*, Lisboa, 7, 1933, p. 1.

(2) G. SANARELLI, *L'impiego dei sacchetti di collodio nello studio del l'ultravirus tuberculare*. *Annali d'Igiene*, 1934, p. 470.

(3) Ces *Annales*, 1932, p. 151, et 1933, p. 180.

(4) *Virus tuberculare filtrabile e tubercolosi atipica sperimentale*. *Rivista Sanitaria Siciliana*, 15 février 1931, p. 283.

(5) *Le sort du BCG dans les sacs de collodion*. *C. R. de la Soc. de Biol.*, 110, 1932, p. 945.

(6) *Culture de l'ultravirus tuberculeux en sacs de collodion introduits dans la cavité péritonéale du cobaye*. *Revue de la Tuberculose*, février 1934, p. 141.

(7) *Ricerche sullo streptococco col metodo delle culture in vivo (sacchetti di collodio)*. *Annali di Clinica medica e di Medic. sperimentale*. Palermo, 1931, p. 129.

(8) *Sur les propriétés ultrafiltrantes de l'Actinomyces bovis Harz à travers les sacs de collodion implantés dans le péritoine du cobaye*. *Bulletin de l'Académie de Médecine*, 110, 1933, p. 797.

(9) *Ricerche sulle Brucelle Bang e Melitensis col metodo delle culture in vivo con sacchetti di collodio*. *Annali di Medicina Navale e Coloniale*, 1933, p. 142.



après quatre mois de séjour dans le péritoine de cobayes.

Au cours de nos nombreuses expériences, nous n'avons trouvé que d'une façon exceptionnelle des sacs de collodion qui s'étaient détériorés dans la cavité péritonéale. Mais dans ces cas, très rares, les altérations résultèrent toujours de causes non imputables à des défauts de confection : managements brusques, traumatismes accidentels sur les parois abdominales des cobayes, introduction de plusieurs sacs doubles, et par conséquent plus volumineux et plus exposés à subir des dégâts dans le péritoine.

En dehors de ces circonstances, tout à fait exceptionnelles et accidentelles, notre longue pratique dans ce genre de recherches nous permet d'affirmer que l'emploi des sacs de collodion représente une technique de laboratoire féconde en applications et dépourvue des inconvénients que, d'une manière tout à fait arbitraire, on a voulu lui attribuer.

## II. — La culture des « protogènes tuberculeux » germés *in vivo*.

Dans notre second mémoire sur l'ultravirus tuberculeux, nous avons dit, entre autres, qu'en ensemençant le contenu de la loge externe des doubles sacs de collodion, où l'on avait constaté la présence des « protogènes tuberculeux », on pouvait obtenir, bien que rarement, des microcultures et même des macrocultures de bacilles tuberculeux.

Nous avons alors employé, de préférence, pour la culture du virus ou de l'ultravirus tuberculeux, les milieux à l'œuf de Dorset-Petroff et, plus spécialement, ceux de Petroff au violet de gentiane, jadis d'un usage courant dans les laboratoires.

Sur ces milieux nous avons, en effet, réussi à obtenir le développement de nos protogènes tuberculeux, soit sous la forme de microcultures (appelées aussi par nous « cultures éphémères »), soit sous la forme de colonies macroscopiques absolument typiques.

Ces cultures avaient poussé après une très longue période d'incubation de trente-cinq à cinquante-quatre jours et ne s'étaient développées que dans quelques cas.

Ce fait nous a conduits à penser que les protogènes tuberculeux sont des éléments délicats et fragiles, et particulièrement exigeants en ce qui concerne leurs besoins nutritifs.

Nous nous sommes alors demandé (1) si, par l'emploi de milieux nutritifs mieux appropriés, nous pouvions obtenir la culture des protogènes d'une manière plus régulière et plus rapide.

Et, puisque, aujourd'hui, le milieu de Löwenstein est généralement connu comme le milieu de culture le plus favorable pour le virus tuberculeux, nous avons repris nos expériences de culture des protogènes en question, en employant ce milieu préparé selon la dernière formule préconisée par son auteur (2).

Nous avons fait nos expériences avec du matériel contenant des protogènes tuberculeux, développés, soit *in vivo*, soit *in vitro*, dans la loge externe des doubles sacs de collodion.

Voici l'exposition sommaire de nos nouvelles expériences :

#### PREMIÈRE SÉRIE D'EXPÉRIENCES *in vivo*.

Le 3 mars 1933 on prépare des sacs doubles de collodion et on introduit dans leur loge interne une émulsion, en liquide de Sauton, de bacilles tuberculeux (souche bovine Vallée) qui s'étaient développés en dix jours sur milieu de Löwenstein.

On choisit des lapins robustes. Dans le péritoine de deux de ces animaux on insère un double sac bacillifère ; dans la cavité péritonéale de deux autres lapins on place deux doubles sacs bacillifères.

EXPÉRIENCE 1. — Lapin n° 1, de 2.350 grammes.

On sacrifie cet animal au bout de trente-cinq jours et on extrait de son abdomen le sac de collodion qui, comme d'ordinaire, se trouve emprisonné dans une enveloppe de tissu conjonctif de nouvelle formation très vascularisé. Le sac est absolument intact. Le contenu de la loge externe, très limpide, est centrifugé durant une demi-heure (3.600 tours par minute). Dans le très léger sédiment qui se forme au fond du tube, on observe des éléments bacillaires extrêmement minces qui, traités par le Ziehl-Neelsen (3), se colorent en bleu. Onensemence la sérosité sur des milieux ordinaires et dans 2 tubes (A et B) de milieu de Löwenstein.

(1) II<sup>e</sup> Mémoire. Ces *Annales*, 1933, p. 202.

(2) La méthode d'hémoculture du virus tuberculeux et de ses résultats. Ces *Annales*, 50, 1933, p. 161.

(3) Disons une fois pour toutes que, pour la double coloration de Ziehl-Neelsen des protogènes tuberculeux, nous avons trouvé préférable — et par conséquent nous l'avons toujours employée — la solution à 1 p. 300 de bleu de méthylène médicinal. Le bleu de méthylène ordinaire des laboratoires se prête mal à ces colorations très délicates.

Les milieux ordinaires restent stériles. Dans l'un des 2 tubes de Löwenstein (A) au contraire, après dix-sept jours d'étuve à 37°, une culture typique de bacilles tuberculeux se développe. Il s'agit de bacilles un peu courts, très granuleux, dont la plupart se montrent déjà acido-alcoolo-résistants. Les repiquages de cette unique colonie dans d'autres tubes de milieu de Löwenstein et sur la pomme de terre glycinée, donnent lieu, au bout de quinze jours, au développement de cultures tuberculeuses typiques.

L'autre tube de Löwenstein (B), gardé en observation pendant cent trois jours, resta stérile.

EXPÉRIENCE 2. — Lapin n° 2, de 2.450 grammes. Sacrifié quarante jours après l'introduction du sac bacillifère dans le péritoine. Le contenu de la loge interne, ensemencé sur Löwenstein donne lieu, au bout de dix jours, au développement de luxuriantes cultures tuberculeuses.

La sérosité de la loge externe (1 c. c. 5 environ) est très limpide. On la centrifuge pendant une demi-heure (3.600 tours par minute). Les préparations du très léger sédiment qui se forme au fond du tube de centrifugation révèlent, par le Ziehl-Neelsen, la présence de granulations très menues et de petits bacilles colorés en bleu (1).

On ensemence la sérosité de la loge externe sur 2 tubes (A et B) de Löwenstein. Ces tubes, surveillés pendant quatre-vingt-dix-sept jours, semblèrent d'abord rester stériles. Mais les préparations faites avec le raclage superficiel décelèrent, pour le tube B, la présence d'une microculture formée par une très grande quantité de petits bacilles dont plusieurs avaient un aspect granuleux, isolés ou groupés en petits amas, colorés en bleu. On lave la surface du milieu avec du liquide de Sauton et avec le liquide de lavage on fait des ensemencements sur milieu de Löwenstein, sur pomme de terre glycinée, sur gélose et en bouillon ordinaire. On injecte 1 cent. cube du même liquide dans la cuisse d'un petit cobaye de 230 grammes qui, disons-le tout de suite, alla en augmentant progressivement de poids et survécut.

Les ensemencements sur pomme de terre, sur gélose et en bouillon restèrent négatifs, même à l'examen microscopique. La culture sur Löwenstein sembla, elle aussi, rester stérile, mais les préparations faites avec le raclage de la surface du milieu, après seize jours d'étuve à 37°, révélèrent la présence d'une grande quantité de petits bacilles rouges, c'est-à-dire acido-résistants, la plupart très granuleux.

On lave cette seconde microculture et on fait des passages sur Löwenstein et sur pomme de terre glycinée. Ce dernier milieu reste stérile; au contraire, à la surface du tube de Löwenstein, on voit se développer, au bout de dix jours seulement d'étuve à 37°, quelques colonies typiques de bacilles tuberculeux acido-alcoolo-résistants.

On injecte une émulsion de ces colonies dans la cuisse d'un petit cobaye (de 270 grammes), qui meurt trente-neuf jours après de tuberculose généralisée.

Dans cette expérience et dans la culture du tube B, les protogènes tuberculeux donnèrent donc lieu, après un premier ensemencement, à une microculture de bacilles non acido-résistants; après un premier repiquage, à une

(1) Pour éviter des répétitions, on se rappellera que lorsque nous parlerons d'éléments bactériens bleus ou rouges, il s'agit de germes non acido-résistants ou acido-résistants après la coloration par le Ziehl-Neelsen.



autre microculture de bacilles acido-résistants; et dans une troisième subculture à une macroculture typique de bacilles acido-résistants.

EXPÉRIENCE 3. — Lapin n° 3, de 2.300 grammes. Sacrifié cinquante-six jours après l'introduction de deux sacs doubles dans le péritoine. L'un de ces sacs (A) est altéré et rempli, dans sa loge externe, d'un liquide trouble. L'autre (B) est intact et plein de sérosité limpide. L'examen microscopique du sédiment provenant de la centrifugation de la sérosité trouble, révèle la présence de très nombreux polynucléaires, mais l'absence complète d'éléments microbiens colorables par le Ziehl-Neelsen.

L'examen du centrifugat de la sérosité limpide, extraite de la loge externe du sac B intact montre au contraire la présence de bacilles minces, isolés ou groupés en petits amas, non acido-résistants et par conséquent colorés en bleu.

On ensemence le contenu bacillifère de la loge interne des deux sacs, dans 2 tubes (a et b) de Löwenstein que l'on porte à l'étuve à 37°.

Au bout de vingt jours, apparaissent dans les 2 tubes des colonies, assez rares, mais typiques, de bacilles tuberculeux. Ce fait signifie, qu'après avoir séjourné cinquante-six jours dans des sacs de collodion placés dans l'abdomen de lapins, les bacilles tuberculeux semblent avoir subi l'influence nuisible du milieu et peut-être aussi du pouvoir bactéricide de la sérosité péritonéale.

On ensemence les sérosités extraites des loges externes de ces deux sacs sur des milieux ordinaires et sur 4 tubes de Löwenstein. Les milieux ordinaires (gélose et bouillon) restent stériles. Les 2 tubes de Löwenstein ensemencés avec la sérosité trouble extraite de la loge externe du sac altéré (A), observés pendant trois mois, restent, eux aussi, stériles; de même l'examen périodique du raclage superficiel du milieu ne décèle aucun germe.

Dans les 2 autres tubes ensemencés avec la sérosité riche en protogènes, extraite de la loge externe du sac B (trouvé intact) on n'observe rien pendant longtemps, mais un raclage superficiel pratiqué le quatre-vingt-unième jour révèle la présence d'une très grande quantité de bacilles minuscules, granuleux, bleus, c'est-à-dire non acido-résistants.

Alors on lave soigneusement les surfaces de ces deux microcultures non apparentes et on fait des subcultures dans d'autres tubes de Löwenstein, de Petroff, de Lubenau et de Petragnani, sur d'autres milieux à l'œuf et dans des milieux ordinaires (pomme de terre glycinée, gélose, bouillon). On inocule une partie du liquide de lavage (18 juillet 1933) dans la cuisse d'un petit cobaye (de 250 grammes). Ce cobaye était encore survivant et pesait 660 grammes au 30 février 1934, c'est-à-dire sept mois plus tard.

Tous les tubes ensemencés sont restés stériles. Quelques examens du raclage des surfaces ensemencées se montrèrent négatifs; négatives furent aussi les subcultures ultérieures, faites quinze jours après les ensemencements.

De ces expériences, en apparence sans résultat, il ressort cependant un ensemble de notions intéressantes.

Avant tout, elles confirment ce que nous avons dit à diverses reprises dans nos précédents mémoires, c'est-à-dire que toutes les fois que le sac bacillifère, placé dans le péritoine d'un

animal, subit une altération quelconque, on le trouve toujours rempli de leucocytes polynucléaires : le contenu du sac devient trouble. Lorsqu'on trouve limpide et transparente la sérosité des sacs, simples ou doubles, on peut avoir la certitude que ces sacs ont été rigoureusement confectionnés et qu'ils se sont conservés intacts. Il suffit donc de la seule inspection ou, tout au plus, d'un simple examen microscopique pour exclure immédiatement toute sorte de doute sur l'intégrité des sacs.

En outre, la constatation du nombre des protogènes tuberculeux dans la loge externe du sac intact B et leur absence dans la loge externe du sac altéré A — absence vérifiée par l'examen le plus soigneux — nous amena à penser que, dans ce dernier cas, les protogènes ont été englobés par les phagocytes, ou éliminés par les polynucléaires attirés à l'intérieur de la loge. On peut supposer, en conséquence, que les protogènes tuberculeux sont doués d'une faible résistance même vis-à-vis de l'action des leucocytes. En effet, les cultures négatives des tubesensemencés avec la sérosité de la loge externe altérée, indiquent que, dans cette sérosité, envahie par les leucocytes, les protogènes tuberculeux étaient complètement absents.

Enfin, le résultat entièrement négatif des cultures et des subcultures dans les tubesensemencés avec la sérosité extraite de la loge externe du sac B, bien que riche en protogènes tuberculeux, et malgré la présence — dans les deux premiers tubes de Löwensteinensemencés depuis quatre-vingt-un jours — de formes bacillaires issues sans aucun doute des protogènes en question, signifie qu'un contact très prolongé des protogènes renfermés dans un milieu confiné, avec la sérosité péritonéale, se montre défavorable au développement de ces fragiles éléments, même dans les milieux nutritifs les plus convenables.

Outre l'insuccès de l'inoculation au cobaye, cette déduction est appuyée par le fait que, dans cette expérience, l'apparition des premières microcultures dans les tubes de Löwenstein a été constatée seulement trois mois après, et les essais de repiquage, dans d'autres milieux nutritifs, sont restés sans résultat.

EXPÉRIENCE 4. — Lapin n° 4, de 2.500 grammes. Sacrifié au bout de soixante-dix jours. De la cavité péritonéale, on extrait les deux sacs doubles parfaitement intacts. Onensemence le contenu des loges internes dans deux tubes

de Löwenstein où seulement trente-cinq jours après poussent respectivement deux et cinq petites colonies tuberculeuses. Un nombre si petit de colonies et leur apparition si tardive, confirment encore une fois que le séjour prolongé, non seulement dans un espace confiné, mais aussi au contact plus ou moins direct de la sérosité péritonéale du lapin, finit par altérer la vitalité des bacilles tuberculeux même adultes et virulents. En effet, la première apparition de macrocultures tuberculeuses dans les tubes de Löwenstein, ensemencés avec tout le liquide bacillifère extrait des loges internes des sacs restés dans le péritoine pendant des périodes de temps différentes, s'est produite, dans ces quatre expériences, suivant cet ordre :

EXPÉRIENCES	SÉJOUR des sacs bacillifères dans le péritoine en jours	APPARITION des colonies dans les tubes de Löwenstein au bout de (en jours)	ASPECT DES CULTURES et nombre des colonies qui se sont développées
I. . . . .	35	8	Développement luxuriant.
II. . . . .	40	10	Cultures luxuriantes.
III. . . . .	56	20	Peu de colonies.
IV. . . . .	70	35	2-5 colonies.

On observe dans ce tableau, non seulement un retard croissant de l'apparition des colonies, mais aussi la raréfaction graduelle de ces dernières. Ce fait amène à penser que, outre un affaiblissement progressif de l'activité végétative, il y eut peut-être une mortalité progressive et massive des bacilles tuberculeux à l'intérieur des sacs.

Nous rappelons avoir déjà signalé, dans notre second mémoire (1), l'action progressivement atténuante qui se manifeste sur les bacilles tuberculeux contenus dans la loge interne des doubles sacs restés longtemps dans la cavité péritonéale du lapin.

Nous montrerons dans la suite qu'un fait analogue se produit aussi dans les expériences *in vitro*, non au contact de la lymphe péritonéale, mais dans un milieu de culture très convenable comme le liquide de Sauton.

Ces constatations à l'égard des bacilles tuberculeux ne sont pas isolées. On sait qu'un long séjour des microbes pathogènes dans des sacs de collodion introduits dans le péritoine ou sous la peau des animaux, exerce une action atténuante et même microbicide.

Dès les premières applications des sacs de collodion dans la technique microbiologique, l'un de nous (2) avait démontré que les bactériidies charbonneuses se multiplient d'abord abondamment, mais sans production de spores, à l'intérieur des sacs ; avec le temps, cependant, leur développement s'arrête et toutes les bactériidies, à la longue, dégèrent et meurent.

Récemment, nous avons démontré qu'un long séjour des bactériidies pathogènes dans les sacs placés dans le péritoine de lapins, en atténue la

(1) Ces *Annales*, 1933, p. 187.

(2) G. SANARELLI, La destruction du virus charbonneux sous la peau des animaux sensibles. Ces *Annales*, 1893, p. 820.



virulence au point de les transformer en vaccins ou en saprophytes non pathogènes (1).

Mais revenons aux résultats de cette quatrième expérience. Le contenu total des loges externes des deux sacs extraits du péritoine du quatrième lapin, est centrifugé pendant une demi-heure (3.600 tours). Les préparations du centrifugat ne décèlent pas le moindre élément, ni granuleux, ni bacillaire. On ensemence la sérosité dans des tubes de Löwenstein que l'on garde à l'étuve plus de trois mois. Aucune apparition de macroculture ou de microculture. Les raclages de la surface des tubes, effectués plusieurs fois, n'ont jamais révélé la présence de formes bactériennes. Évidemment, en raison de la permanence trop prolongée dans un milieu confiné et au contact immédiat de la sérosité péritonéale du lapin, les protogènes qui se sont formés dans les loges externes des sacs, ont subi une lyse complète.

### III. — La culture des « protogènes tuberculeux » germés *in vitro*.

L'ensemble des résultats de cette première série de recherches a confirmé encore une fois que l'on peut obtenir des cultures typiques de bacilles tuberculeux, par des ensemencements directs de leurs protogènes, développés *in vivo*, à l'intérieur des doubles sacs de collodion.

Mais ce fait a lieu seulement quand les protogènes n'ont pas trop subi l'influence nuisible du contact prolongé avec la sérosité péritonéale du lapin, sérosité qui se montre nettement dangereuse à la vie des microbes quand elle acquiert — spécialement dans le milieu confiné et clos des sacs — une certaine concentration dans le liquide de Sauton.

On a vu, en effet, que les protogènes ont donné, sur Löwenstein, une macroculture tuberculeuse typique au bout de dix-sept jours seulement, quand ils étaient restés trente-cinq jours dans le péritoine ; mais les protogènes extraits après un séjour de quarante jours dans le péritoine, ont exigé quatre-vingt-dix-sept jours pour donner seulement des microcultures non virulentes. Ces microcultures ont toutefois produit des submicrocultures à développement plus accéléré (en seize jours) ; enfin, lors d'un troisième passage et après dix jours seulement de latence, elles ont donné des macrocultures typiques, douées d'une virulence normale pour le cobaye.

(1) G. SANARELLI et A. ALESSANDRINI, Atténuation graduée, permanente et héréditaire, de la bactériodie charbonneuse par la lymphe péritonéale du lapin. Ces *Annales*, 51, 1935, p. 40.

Après un séjour plus prolongé, de cinquante-six jours, dans le péritoine du lapin, les protogènes, extraits de la loge externe des sacs, se montrent au microscope avec leur aspect bacillaire ordinaire ; mais dans les milieux de Löwenstein ils ne se développent qu'après quatre-vingt-un jours sous la forme d'une maigre microculture, constituée par de petits et minces bacilles granuleux, non acido-résistants, non virulents et incapables de se reproduire dans les subcultures ultérieures.

Enfin, lorsqu'on extrait le sac de collodion, après soixante-dix jours de séjour dans le péritoine, on n'observe, dans la sérosité de la loge externe, que des granulations bleues, incapables comme toujours de se reproduire même dans les milieux de Löwenstein. Elles ne donnent ni microcultures, ni cultures éphémères.

Ces résultats démontrent qu'une pénétration limitée de la sérosité péritonéale dans la loge externe du sac n'empêche pas, d'abord, le développement des protogènes. Mais, plus tard, la sérosité péritonéale pénètre dans cette loge et se mêle en proportion excessive avec le liquide de Sauton, exerçant alors ses effets bactéricides. S'ajoutant aux conditions dysgénésiques représentées par un espace confiné et mal aéré l'action de la sérosité non seulement nuit à la vitalité et au pouvoir reproductif des protogènes, mais encore elle les affaiblit au point de les détruire complètement.

Nous sommes ainsi amenés à conclure que, pour obtenir dans la loge externe des doubles sacs de collodion la prolifération des protogènes, on peut même négliger de placer les sacs dans le péritoine des animaux. Nous avons donc pensé que des résultats, peut-être meilleurs, pouvaient être obtenus par l'introduction et le séjour des doubles sacs bacillifères dans des tubes ne contenant que du liquide de Sauton. Dans ce but, nous avons entrepris une seconde série d'expériences *in vitro*.

## DEUXIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES *in vitro*.

### *Premier groupe.*

Le 29 juin 1933, on remplit, comme d'ordinaire, les loges internes de onze sacs doubles de collodion, avec des émulsions de bacilles tuberculeux jeunes. Les loges externes reçoivent du liquide de Sauton. Les sacs pré-

parés de la sorte sont placés dans autant de grands tubes à essai contenant du liquide de Sauton. On laisse ces tubes à l'étuve à 37°.

EXPÉRIENCE 1. — On extrait les doubles sacs des tubes n° 7 et 8, au bout de trente cinq jours. Les préparations de centrifugat du liquide de la loge externe des sacs, contiennent des granulations bleues très menues. Les ensemencements du même liquide dans 2 tubes de Löwenstein restent stériles. Dans 2 autres tubes de ce milieu, ensemencés avec le contenu de la loge interne des deux sacs, on voit se développer régulièrement, au bout de douze jours, des macrocultures tuberculeuses typiques.

EXPÉRIENCE 2. — On extrait les sacs des tubes n° 2 et n° 6 au bout de quarante-cinq jours. Les préparations de centrifugat du liquide de la loge externe du sac extrait du tube n° 2, montrent de très rares bacilles et des granulations bleues. Mais les ensemencements de ce liquide restent négatifs.

Dans les préparations du centrifugat du liquide de la loge externe du sac extrait du tube n° 6, on observe de nombreuses granulations et des bacilles bleus, minces, isolés ou groupés en petits amas de trois à quatre éléments. Quelques-uns de ces bacilles semblent constitués par de fines granulations.

Les bacilles tuberculeux contenus dans la loge interne de ce sac se montrent rapetissés et très granuleux, mais leur acido-résistance est parfaitement conservée.

On ensemence le contenu de chacune des deux loges, interne et externe, de ce sac n° 6, dans 2 tubes de Löwenstein. Au bout de douze jours, dans le tube ensemencé avec le contenu bacillifère de la loge interne, se développent des cultures tuberculeuses typiques. Après trente-huit jours, on racle la surface, apparemment stérile, du tube ensemencé avec le liquide riche en protogènes tuberculeux, extrait de la loge externe. Dans les préparations, on observe de nombreux bacilles bleus, petits, en grande partie granuleux, isolés ou réunis en amas. Il s'agit d'un commencement de microculture. On procède alors à une subculture dans un autre tube de Löwenstein. La microculture originelle reste, cependant, constamment inaltérée.

Au bout de dix-sept jours, on observe, vers le fond du tube de la subculture, une autre microculture ayant l'aspect d'un voile presque imperceptible, semblable à de la rosée. Ce voile est formé d'une grande quantité de granulations et de nombreux petits bacilles colorés en rouge, c'est-à-dire doués d'acido-résistance.

On doit se rappeler qu'Arloing et Dufourt (1) considèrent aussi les bacilles acido-résistants des microcultures comme dérivant directement de l'ultravirus tuberculeux.

Plus tard, au vingt-troisième jour de l'ensemencement de la subculture, à l'endroit de la microculture primitive ayant l'aspect de rosée, ont déjà poussé maintes petites colonies typiques de bacilles tuberculeux. Ces colonies ne se développèrent pas ultérieurement. Mais un passage sur pomme de terre glycinée donna lieu, au bout de huit jours, à une macroculture tuberculeuse luxuriante et caractéristique.

Dans ce cas, on a donc observé le même fait déjà remarqué dans les pré-

(1) Sur les relations qui existent entre l'ultravirus tuberculeux et les microcultures de Löwenstein. *C. R. de la Soc. de Biologie*, 115, 1934, p. 1111.



cédentes expériences *in vivo*, c'est-à-dire l'adaptation graduelle des protogènes non acido-résistants, germés *in vitro*, à l'ultérieure prolifération sur des milieux artificiels : d'abord sous la forme de microcultures apparemment non visibles et formées de bacilles non encore acido-résistants ; ensuite, sous l'aspect typique de macrocultures tuberculeuses, formées de bacilles acido-résistants.

EXPÉRIENCE 3. — Au bout de cinquante-six jours (le 24 août), on extrait les doubles sacs de collodion des tubes n° 1 et n° 11.

Le centrifugat de la sérosité des loges externes de ces deux sacs révèle de rares granulations bleues, très menues. Mais les ensemencements dans 2 tubes de Löwenstein restent négatifs ; négatives aussi restent les subcultures effectuées après vingt-deux jours de séjour à l'étuve.

Les cultures du contenu des loges internes se montrent positives au bout de vingt-deux jours.

EXPÉRIENCE 4. — Au bout de soixante-deux jours, le 21 août, on extrait les tubes n° 3, 4, 5 et 10.

On recueille tout le liquide contenu dans les loges externes de ces quatre sacs, dans un tube unique et on le centrifuge durant une demi-heure (3.600 tours).

Le centrifugat se montre, au microscope, riche en protogènes granuliformes, teints en bleu. Onensemence le liquide dans 2 tubes de Löwenstein.

De même onensemence, dans 4 tubes de Löwenstein, le contenu extrait respectivement des loges internes des quatre sacs. Dans ces derniers tubes apparurent après vingt-cinq jours seulement (25 septembre) des macrocultures tuberculeuses typiques.

Au contraire, dans les 2 tubes ensemencés avec le liquide des loges externes, il ne se développe rien, pas même une microculture.

Après treize jours d'étuve, on racle la surface de ces tubes et avec le raclage on pratique des ensemencements (2 subcultures).

Le 21 octobre, le 4 novembre et le 1<sup>er</sup> décembre on fait, par quatre fois, des subcultures. Le résultat fut toujours négatif.

Les protogènes granuliformes de ces quatre sacs ne réussissent donc pas à se développer sur les milieux de Löwenstein.

EXPÉRIENCE 5. — Enfin, au bout de quatre-vingt-quatre jours, on extrait le dernier sac double du tube n° 9.

Les ensemencements sur 2 tubes de Löwenstein du liquide de la loge interne donnent lieu seulement, quatre-vingt-onze jours après, à de très rares colonies tuberculeuses. Evidemment le long séjour dans un milieu confiné et insuffisamment aéré a affaibli — de même que dans la précédente expérience — les possibilités végétatives des bacilles tuberculeux.

Le liquide de la loge externe de ce double sac, extrait après une immersion si prolongée dans le liquide de Sauton, ne montre aucune trace de protogènes. Les colorations ne révèlent même pas la présence de granulations bleues.

Les ensemencements sur Löwenstein restent, eux aussi, stériles ; il en fut de même pour deux séries de subcultures pratiquées successivement.

Ces expériences *in vitro* vérifient tout d'abord le fait que nous avons décrit plus haut, en exposant les expériences *in vivo*. Nous avons, en effet, constaté que les premières colonies dans les tubes de Löwenstein ensemencés avec les émulsions bacillifères des loges internes des sacs restés plongés plusieurs jours dans les tubes contenant le liquide de Sauton, ont apparu d'autant plus tard et se sont montrées d'autant plus pauvres que le sac bacillifère était resté plus longtemps dans le liquide.

Cela ressort clairement du tableau suivant :

EXPÉRIENCES	SÉJOUR des sacs dans le liquide de Sauton en jours	APPARITION des colonies dans les tubes de Löwenstein au bout de (en jours)	ASPECT DES CULTURES
I . . . . .	35	12	Culture typique.
II . . . . .	45	12	Culture typique.
III . . . . .	56	22	Peu de colonies.
IV. . . . .	62	25	Peu de colonies.
V . . . . .	84	31	Très peu de colonies.

Ce tableau est peut-être encore plus démonstratif que celui concernant les expériences *in vivo*. Car ici nous devons exclure un agent important d'atténuation microbienne, à savoir le pouvoir bactéricide de la sérosité péritonéale, puisqu'il ne s'agit que de liquide de Sauton, un des meilleurs milieux nutritifs pour le bacille tuberculeux. L'affaiblissement progressif de la vitalité et aussi la mort des bacilles tuberculeux contenus dans les loges internes des doubles sacs de collodion ne peuvent, par conséquent, être imputés à d'autres influences.

Il faut, en effet, tenir compte que les bacilles tuberculeux sont des microbes très aérobies. Cela est d'autant plus vrai que, même dans les cultures dans un milieu liquide quelconque, ils ne se développent bien qu'en surface. Quand le matériel ensemencé tombe au fond des tubes ou des matras de bouillon ou de liquide de Sauton, les cultures, comme on sait, ne se développent pas.

De toutes nos expériences avec les sacs de collodion, simples ou doubles, il ressort que les bacilles tuberculeux introduits dans les sacs s'y multiplient très peu ; ils tendent à s'agglutiner

en petits amas, laissant toujours limpide le liquide dans lequel on les a émulsionnés. A la longue, on constate au microscope que les bacilles se rapetissent, tendent à devenir granuleux et à se résoudre en granulations. On y décèle toutefois des éléments bleus, c'est-à-dire de nouvelle formation et non capables — pendant leur séjour dans le sac de collodion — d'acquérir l'acido-résistance.

Il est probable que les éléments ultrafiltrables qui traversent la paroi de la loge interne du sac, pour atteindre la loge externe et s'y développer, comme protogènes, proviennent de ces formes jeunes. La présence de celles-ci témoigne sans doute d'une activité proliférative, quoique limitée et passagère, des bacilles auparavant introduits dans la loge interne.

Les milieux clos, confinés et sans air, atténuent donc, à la longue, soit *in vivo*, soit *in vitro* le pouvoir végétatif des bacilles tuberculeux qui y séjournent. Un très grand nombre peut-être y périclissent, si l'on en juge par le petit nombre de colonies qui apparaissent dans les tubes de Löwenstein ensemencés avec des bacilles qui ont séjourné plus longtemps dans les sacs, soit *in vivo* ou *in vitro*.

Ces résultats posent la question de savoir si c'est en raison de cette absolue nécessité biologique et non pour d'autres causes anatomo-physiologiques, que les bacilles tuberculeux s'implantent, se localisent et se multiplient de préférence dans l'organisme vivant, dans les tissus de l'organe qui est le plus aéré, le plus riche en sang oxygéné, c'est-à-dire le poumon.

A cet égard, on peut aussi se demander si les résultats bienfaisants de la collapsothérapie relèvent peut-être plus que d'autres causes mal déterminées, des conditions d'anaérobiose relative auxquelles on réduit l'organe bacillisé et que l'on rend atelectasique, dans des conditions telles qu'on pourrait le considérer comme moins favorable au développement local des bacilles tuberculeux. D'autre part, nous savons que, en général, le tissu pulmonaire est, en soi, bien prémuni contre l'action des microbes.

Des observations de notre seconde série d'expériences nous pouvons donc, en ce qui concerne les protogènes tuberculeux, tirer les premières conclusions suivantes :

Les protogènes peuvent se développer, non seulement *in vivo*,



mais aussi *in vitro*. Cela est démontré par le fait qu'on les a observés, sous l'aspect bacillaire ou granuleux, dans presque toutes les sérosités des loges externes des doubles sacs plongés dans le liquide de Sauton et ayant séjourné de trois à quatre jours à l'étuve.

Mais leur adaptation ultérieure et leur développement, même dans les milieux les plus convenables, ont été, comme cela ressort de ces expériences *in vitro*, absolument exceptionnels. On ne les a observés qu'une seule fois, dans la deuxième expérience où on a obtenu en premier lieu une microculture non apparente, constituée par des bacilles tuberculeux non acido-résistants; dans une seconde subculture, les bacilles ont acquis l'acido-résistance et, peu à peu, des colonies visibles à l'œil nu ont apparu. Des cultures luxuriantes se sont développées seulement lors de passages ultérieurs.

Tout cela signifie donc, nous le répétons, que les protogènes tuberculeux sont des éléments très fragiles, qui s'implantent avec une grande difficulté même dans les milieux aujourd'hui considérés comme les plus favorables. D'ailleurs, il semble aussi que le séjour dans l'espace confiné et sans air des sacs de collodion, de même qu'il est peu favorable aux bacilles tuberculeux, soit, à la longue, préjudiciable à leurs protogènes, qui sont encore plus délicats et plus exigeants.

En effet, dans la dernière expérience de cette première série, la recherche de ces éléments faite après quatre-vingt-quatre jours de séjour du double sac dans le liquide de Sauton, fut négative.

On peut donc admettre qu'ils étaient déjà lysés.

\*  
\* \*

Les résultats peu satisfaisants de cette première série d'expériences *in vitro*, nous a conduits à essayer de diminuer le séjour des doubles sacs bacillifères dans le liquide de Sauton.

Nous avons fait une seconde série d'expériences *in vitro*, le 5 septembre 1933, en introduisant dix doubles sacs bacillifères — confectionnés comme nous l'avons déjà dit — dans dix gros tubes à essai pleins de liquide de Sauton.

Voici les résultats de ces nouvelles expériences.

*Deuxième groupe.*

EXPÉRIENCE 1. — Le 19 septembre, c'est-à-dire après quatorze jours d'immersion, on extrait les doubles sacs des tubes n<sup>os</sup> 3, 4, 5 et 9. Les tubes n<sup>os</sup> 3 et 5 sont pollués par le développement accidentel d'un *B. mesentericus* ; en conséquence, on en néglige l'examen.

On ensemente séparément les sérosités très limpides, extraites de la loge externe des autres deux sacs, n<sup>o</sup> 4 et n<sup>o</sup> 9, dans deux tubes de Löwenstein et sur pomme de terre glycinée. Le résultat fut négatif. De même, furent négatifs les examens répétés du raclage des milieux nutritifs et quatre tentatives de subculture effectuées le 31 septembre, le 21 octobre, le 4 novembre et le 1<sup>er</sup> décembre.

EXPÉRIENCE 2. — Le 25 septembre, soit après vingt jours d'immersion, on extrait les doubles sacs des deux tubes n<sup>os</sup> 6 et 7. Le contenu de la loge externe se montre très limpide. On centrifuge dans trois petits tubes séparément, pendant une demi-heure, à 3.600 tours. L'examen microscopique décèle dans les trois centrifugats, de très menues granulations bleues. On ensemente dans des tubes de Löwenstein et sur pomme de terre glycinée. Aucune culture n'a été obtenue ; les examens périodiques et les nombreux essais de subcultures pratiqués n'aboutirent à aucun résultat.

EXPÉRIENCE 3. — Le 5 octobre, c'est-à-dire après trente jours d'immersion, on extrait les doubles sacs n<sup>o</sup> 1 et n<sup>o</sup> 2. Le centrifugat des deux loges externes montre la présence d'un grand nombre de granulations et de petits bacilles bleus.

On ensemente tout le contenu des deux loges dans deux tubes de Löwenstein et sur pomme de terre glycinée.

Au bout de quinze jours, on observe dans l'un de ces tubes, la soudaine apparition de trois colonies très petites, à peine visibles, qui, après avoir été quelque peu altérées par des prélèvements restèrent longtemps stationnaires.

Les préparations faites immédiatement après l'apparition de ces colonies, décelèrent la présence de bacilles tuberculeux typiques, en grande partie non encore acido-résistants. Les jours suivants, tous les bacilles deviennent acido-résistants, mais les colonies, probablement parce qu'elles avaient été entamées, ne reprirent leur développement que quelques semaines plus tard, tout en demeurant très petites. Les repiquages sur d'autres tubes de Löwenstein et sur pomme de terre glycinée, de ces premières colonies malingres, donnèrent lieu, au bout de seize à dix-huit jours, à des macrocultures tuberculeuses typiques.

Une petite dose de bacilles prélevée de ces cultures, inoculée dans la cuisse d'un cobaye de 230 grammes, amena la mort en quarante-deux jours par tuberculose généralisée.

Les deux tubes de pommes de terre restèrent stériles.

EXPÉRIENCE 4. — Le 10 octobre, c'est-à-dire après trente-cinq jours d'immersion, on extrait les doubles sacs des tubes n<sup>o</sup> 8 et n<sup>o</sup> 10. On mélange le contenu des deux loges externes, qui se montre très limpide et on le centrifuge pendant une demi-heure à 3.600 tours.

Les préparations du léger sédiment montrent la présence d'un grand nombre de granulations et d'une certaine quantité de petits bacilles colorés en bleu. On ensemence tout le contenu des deux loges externes sur deux tubes de Löwenstein et sur deux pommes de terre glycinées. Ces dernières restèrent stériles. Mais le 4 novembre, c'est-à-dire vingt-quatre jours après l'ensemencement, on remarque, à la surface d'un tube de Löwenstein, vers le fond et au bord du milieu, l'apparition presque soudaine d'une très petite colonie. On laisse cette colonie se développer et, le 9 novembre, on en fait une préparation colorée avec Ziehl-Neelsen. Celle-ci fourmille de petits bacilles acido-alcool-résistants, en grande partie granuleux, isolés ou réunis en petits amas et dont plusieurs contiennent des granulations bleues, comparables à des granulations métachromatiques. Les bacilles ont exactement le même aspect que ceux de la figure 8 (planche II) de notre second mémoire sur l'ultravirus tuberculeux, qui reproduit des bacilles d'une culture sur milieu de Petroff, apparue trente-six jours après l'ensemencement de la lymphe extraite de la loge externe d'un double sac resté pendant trente jours dans le péritoine d'un lapin.

Ces granulations bleues correspondent à celles décrites par Morton C. Kahn (1) comme des corpuscules polaires de bacilles tuberculeux récemment germés.

A partir de cette colonie, on fait des subcultures sur Löwenstein et sur pomme de terre glycinée. Au bout de quatorze jours apparaissent dans tous ces milieux des macrocultures tuberculeuses typiques.

Cette seconde série d'expériences *in vitro* démontre également que la culture des protogènes tuberculeux dans les milieux les plus favorables, est très difficile et irrégulière. Néanmoins, tenant compte de tous ces résultats, on est amené à admettre que le moment le plus favorable de leur développement par ensemencement, sur les milieux artificiels, serait compris entre le trentième et le quarante-cinquième jours après l'introduction des sacs bacillifères *in vivo*, dans le péritoine des animaux ou *in vitro*, dans des tubes contenant du liquide de Sauton.

### Résumé et conclusions.

Dans cette nouvelle série d'expériences sur le virus tuberculeux, en employant *in vivo* et *in vitro* nos doubles sacs bacillifères de collodion, nous nous sommes avant tout proposé de vérifier si l'on peut obtenir plus facilement des cultures directes des protogènes sur les milieux d'élection considérés aujour-

(1) Cycle de développement du bacille tuberculeux, d'après l'étude des germes vivants isolés. Ces *Annales*, 44, 1930, p. 259.



d'hui comme bien plus favorables que ceux que nous avons précédemment employés.

Nous avons cherché, ensuite, à établir les moyens et les limites d'utilisation des sacs de collodion pour ce genre de recherches; car il est logique de ne pas exiger d'un procédé technique plus de ce qu'il peut effectivement donner.

De l'ensemble de nos observations, nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

1° Il est confirmé que les protogènes tuberculeux qui se sont développés dans les loges externes des doubles sacs bacillifères de collodion, restés quelque temps dans la cavité péritonéale des lapins ou dans des tubes contenant du liquide de Sauton, peuvent s'implanter et se développer également dans le nouveau milieu de Löwenstein, aujourd'hui considéré comme le milieu d'élection pour les cultures tuberculeuses. Les protogènes tuberculeux, le plus souvent très faiblement pathogènes ou même non pathogènes pour les cobayes, peuvent se développer, dans ce milieu, en macrocultures tuberculigènes typiques ou en microcultures non apparentes et non pathogènes. Ces dernières cultures sont cependant capables de produire, par subculture, des macrocultures douées de propriétés tuberculigènes.

2° L'emploi de milieux nutritifs à l'œuf est indispensable pour obtenir la culture des protogènes tuberculeux; les autres milieux ne conviennent pas. Mais les plus grandes probabilités d'implantation des protogènes, même sur le milieu de Löwenstein, se rencontrent seulement quand on prélève les protogènes de la loge externe des doubles sacs du collodion, du trentième au quarante-cinquième jour après leur introduction dans le péritoine des lapins, ou dans des tubes contenant du liquide de Sauton.

3° Un séjour plus long, *in vivo* ou *in vitro*, affaiblit progressivement la vitalité et le pouvoir d'adaptation et de multiplication des protogènes tuberculeux. Parmi les facteurs susceptibles d'empêcher le développement ultérieur des protogènes qui se sont déjà développés dans les sacs placés dans le péritoine des animaux, il faut tenir aussi compte, bien qu'elle soit faible, de l'action bactéricide exercée par la sérosité péritonéale. En effet, lesensemencements des protogènes, même

présents en grand nombre dans le liquide extrait des loges externes des doubles sacs restés dans le péritoine des lapins ou dans le liquide de Sauton plus de quarante jours, demeurent stériles ou donnent lieu seulement à des microcultures tardives et limitées.

On doit toutefois remarquer que, dans quelques cas, on a pu obtenir, par réensemencements successifs de ces microcultures, d'authentiques et typiques macrocultures tuberculeuses.

Au delà du cinquante-sixième jour de séjour, *in vivo* ou *in vitro*, même en partant de sérosités riches en protogènes tuberculeux, on ne réussit plus à obtenir des macrocultures tuberculeuses, ni dans les premiers ensemencements, ni dans les réensemencements successifs.

A partir du soixante-dixième jour, non seulement on n'obtient plus ni microcultures, ni macrocultures, mais dans le contenu des loges externes des doubles sacs, on ne trouve même pas d'éléments colorables, granuleux ou bacillaires. On peut en déduire que les protogènes, après un si long séjour dans des milieux devenus impropres ou nuisibles, finissent par mourir et par se dissoudre.

4° La diminution progressive du pouvoir végétatif des protogènes tuberculeux, se produit aussi dans les doubles sacs de collodion restés plongés longtemps dans le liquide de Sauton qui, pourtant, constitue un excellent milieu nutritif. Cela conduit à penser que, dans ces cas, c'est le trop long séjour dans ces milieux confinés et sans air, qui influe sur la dégradation progressive des protogènes tuberculeux, sur l'arrêt de leur développement et sur leur destruction.

5° Le séjour prolongé dans des milieux confinés et sans air, se montre nuisible même aux bacilles tuberculeux adultes et virulents. Plus on retarde l'extraction des doubles sacs de collodion du péritoine et des tubes de Sauton, et plus, par conséquent, on tarde à ensemercer le liquide bacillifère contenu dans la loge interne des doubles sacs, plus tardives et plus rares pousseront et se développeront les colonies tuberculeuses dans les milieux de Löwenstein.

Cela signifie que les bacilles tuberculeux, séjournant longtemps dans les conditions exposées tout à l'heure doivent, à la longue, dégénérer et mourir. On comprend mieux ainsi pour-

quoi les bacilles tuberculeux se localisent de préférence dans un organe humain bien oxygéné et bien vascularisé comme le poumon, et on s'explique mieux les résultats heureux de la collapsothérapie dans la tuberculose pulmonaire.

6° La technique des doubles sacs de collodion se prête très bien pour révéler l'existence des éléments filtrables du virus tuberculeux, pour déceler les premières phases de leur germination ainsi que de leur développement, et pour obtenir, au moyen de macrocultures ou microcultures successives sur des milieux appropriés, la démonstration de l'existence d'un cycle évolutif dans la biologie du bacille tuberculeux.

L'inconstance des cultures positives, que l'on constate nécessairement dans lesensemencements des protogènes tuberculeux, même en employant les milieux les plus favorables, relève du fait que les protogènes obtenus des sacs de collodion ne présentent eux-mêmes qu'un faible pouvoir végétatif, car ils ont germé et se sont développés dans un milieu confiné et sans air, c'est-à-dire dans des conditions absolument contraires à leurs plus indispensables exigences biologiques.



# **PRÉMUNITION ANTITUBERCULEUSE DU COBAYE ET DU LAPIN NOUVEAU-NÉS AU MOYEN DU BCG ABSORBÉ PAR LA VOIE BUCCALE**

par L. NÈGRE.

*(Institut Pasteur. Laboratoire de recherches sur la tuberculose.)*

Dans deux mémoires antérieurs (1), nous avons étudié, avec A. Calmette et A. Boquet, la prémunition du cobaye et du lapin contre une infection tuberculeuse virulente au moyen du BCG introduit par les voies sous-cutanée et sanguine.

Nous avons constaté que les cobayes qui ont reçu 25 à 30 milligrammes de BCG sous la peau, ou 5 milligrammes par la voie sanguine présentent une résistance à une infection d'épreuve qui dure six mois après la vaccination et se traduit par un retard de l'évolution de cette infection par rapport aux témoins.

Les lapins qui ont reçu dans la veine 15 à 20 milligrammes de BCG et qui sont éprouvés ensuite par inoculation intra-veineuse de 0 milligr. 001 ou 0 milligr. 0001 d'une souche bovine virulente, présentent, comme les cobayes, une résistance passagère manifeste à cette infection d'épreuve.

Tous ces résultats ont été confirmés par les travaux d'Imamura et Takahashii, Lange et Lydtin, Okell et Parish, Rancovitz, Rolle, Satake, Tzekhnovitzer et Kochkine, etc.

Dans un travail ultérieur (2), effectué avec A. Calmette et A. Boquet, nous avons montré que l'absorption répétée plusieurs fois de bacilles biliés par la voie buccale (6 repas de 10 milligrammes et 4 repas de 20 milligrammes à vingt-quatre heures d'intervalle), est susceptible de conférer aux jeunes cobayes une résistance appréciable aux infections massives

(1) Ces *Annales*, 35, septembre 1921 ; 36, septembre 1922.

(2) Ces *Annales*, 38, mai 1924.

artificiellement réalisées par la même voie (2 repas à vingt-quatre heures d'intervalle de 5 milligrammes d'une souche de bacilles tuberculeux virulents d'origine bovine).

Alors que les témoins meurent deux mois et demi à trois mois et demi après l'infection avec des lésions tuberculeuses généralisées à tous les organes, les cobayes prémunis par ingestion de BCG ne présentent, au même moment, que des adénites mésentériques et quelques rares tubercules sur la rate et les poumons. Trois à quatre mois après le repas infectant, la résistance des animaux vaccinés fléchit et leurs lésions tendent à se généraliser à tous les organes.

La même expérience effectuée chez des cobayes adultes a donné des résultats moins probants.

Dans les nouvelles expériences que nous relatons dans ce mémoire, nous avons cherché à nous rendre compte si, en prenant pour l'infection d'épreuve une voie autre que la voie buccale utilisée pour l'immunisation des cobayes, il serait possible de mettre en évidence chez ces derniers une certaine résistance à la tuberculose.

Pour nous placer, comme la première fois, dans des conditions se rapprochant le plus possible de l'infection naturelle, nous avons choisi la voie oculaire préconisée par A. Calmette et V. Grysez.

En employant la voie buccale comme voie d'introduction du BCG et la voie oculaire pour l'épreuve virulente, nous avons étudié la résistance conférée par ce bacille-vaccin au cobaye nouveau-né. Nous avons, d'autre part, observé chez les animaux vaccinés les effets des revaccinations effectuées par la même voie. D'autres expériences ont porté sur l'immunisation du lapin nouveau-né par la voie buccale et sur l'influence du fractionnement des doses dans la prémunition du cobaye par la voie buccale et sa revaccination par la voie sous-cutanée.

PRÉMUNITION DU COBAYE NOUVEAU-NÉ PAR INGESTION  
DE 4 A 6 CENTIGRAMMES DE BCG  
DANS LES DIX JOURS QUI SUIVENT LA NAISSANCE.

EXPÉRIENCE. — 4 cobayes nouveau-nés ingèrent quatre fois 1 centigramme de BCG les deuxième, quatrième, sixième et huitième jours après leur naissance.

Deux mois après, ils sont éprouvés, ainsi que 4 témoins du même âge, par instillation oculaire de 0 milligr. 1 de la souche bovine Vallée.

Ils sont sacrifiés deux mois après l'infection.

Les vaccinés ont des ganglions sous-maxillaires et cervicaux moins nombreux et moins volumineux que les cobayes témoins. Deux n'ont aucun tubercule sur la rate, le troisième a 2 tubercules et le quatrième 3 tubercules sur la rate. Les cobayes témoins ont 2, 3, 5 et 6 tubercules sur leur rate qui est plus hypertrophiée que celles des vaccinés.

EXPÉRIENCE. — 4 cobayes nouveau-nés ingèrent six fois 1 centigramme de BCG, les deuxième, quatrième, cinquième, sixième, septième et huitième jours après leur naissance. Un meurt dans le mois suivant.

Deux mois après, ils sont éprouvés, ainsi que 2 témoins du même âge, par instillation oculaire de 0 milligr. 01 de la souche bovine Vallée.

Ils sont sacrifiés deux mois après cette épreuve.

Chez les cobayes prémunis, les ganglions sous-maxillaires et cervicaux sont moins hypertrophiés que chez les témoins et non caséeux. Leur rate est encore indemne de toute lésion.

Les témoins ont des ganglions plus volumineux et caséeux. Leur rate présente 4 à 5 tubercules.

Les cobayes nouveau-nés prémunis dans les jours qui suivent leur naissance, par ingestion de 4 à 6 centigrammes de BCG, ont, d'après ces expériences, deux mois après l'épreuve virulente, des lésions moins prononcées que les témoins. La différence entre les prémunis et les non prémunis apparaît plus nettement lorsque la dose infectante est réduite : 0 milligr. 01 au lieu de 0 milligr. 1 par instillation oculaire.

#### PRÉMUNITION DU COBAYE NOUVEAU-NÉ PAR LA VOIE BUCCALE ET REVACCINATION PAR LA MÊME VOIE.

Après avoir constaté que l'ingestion de 4 à 6 centigrammes de BCG dans les dix jours qui suivent la naissance donne au cobaye une certaine résistance à une infection virulente d'épreuve réalisée par la voie oculaire, nous avons cherché à voir comment les revaccinations effectuées par la même voie entretiennent cette immunité.



EXPÉRIENCE. — 2 cobayes nouveau-nés ingèrent 1 centigramme de BCG les septième, huitième, neuvième et dixième jours après leur naissance, au total 4 centigrammes. Cinquante-quatre jours après cette ingestion, ils réagissent positivement, par un léger épaississement de la peau, à une intradermo-réaction faite avec 0 c. c. 01 de tuberculine brute.

Soixante-dix jours après, cette réaction est de nouveau effectuée. Elle est nécrotique chez le cobaye n° 1. Elle continue à ne se manifester que par un léger épaississement de la peau chez le cobaye n° 2.

Quatre-vingt-deux jours après la première vaccination, ces 2 cobayes ingèrent de nouveau, quatre jours de suite, 1 centigramme de BCG.

Deux mois après cette revaccination, ces deux cobayes réagissent à la tuberculine toujours de la même façon, le n° 1, par une réaction nécrotique, le n° 2 par un léger épaississement.

Quatre mois après cette revaccination, les réactions à la tuberculine deviennent négatives chez ces deux animaux.

Ils sont à ce moment éprouvés, ainsi que deux témoins, par instillation oculaire de 0 milligr. 01 de la souche bovine Vallée.

Sacrifiés deux mois après cette infection virulente, les lésions ganglionnaires sous-maxillaires et cervicales des vaccinés et des témoins sont à peu près semblables. Les témoins ont 7 à 8 tubercules sur la rate, alors que les prémunis n'en ont que 1 ou 2.

EXPÉRIENCE. — 2 cobayes nouveau-nés ingèrent 1 centigramme de BCG les huitième, neuvième, dixième, onzième et douzième jours après leur naissance, au total 5 centigrammes de BCG.

Cinquante et un jours après, l'intradermo-réaction à la tuberculine reste chez eux négative.

Soixante-deux jours après, elle est positive chez le cobaye n° 1 sous la forme d'un épaississement de la peau, négative chez le n° 2.

Ces 2 cobayes sont à ce moment revaccinés par ingestion de 1 centigramme de BCG quatre jours de suite, au total 4 centigrammes. Quinze jours après, ils ingèrent encore, quatre jours de suite, 1 centigramme de BCG, au total 4 centigrammes.

Six semaines après cette revaccination, ils réagissent à l'intradermo-réaction tuberculinique par un épaississement de la peau.

Trois mois après cette revaccination, cette réaction, effectuée de nouveau, est nécrotique.

Ces cobayes sont alors éprouvés, ainsi que 2 témoins, par instillation oculaire de 0 milligr. 1 de la souche bovine Vallée.

Ils sont sacrifiés deux mois après cette épreuve.

Leurs ganglions sous-maxillaires et cervicaux sont un peu plus gros que ceux des témoins et, comme eux, caséeux. La rate des prémunis ne présente que 1 ou 2 tubercules, alors que celle des témoins en a 6 ou 7.

EXPÉRIENCE. — 2 cobayes nouveau-nés ingèrent 1 centigramme de BCG les deuxième, troisième, quatrième et cinquième jours après leur naissance, soit au total 4 centigrammes.

Un mois après, le cobaye n° 1 réagit à l'intradermo-réaction à la tuberculine par un épaississement de la peau, le cobaye n° 2 ne réagit pas.

Ils sont revaccinés à ce moment par ingestion de 1 centigramme de BCG, quatre jours de suite, au total 4 centigrammes.

Six semaines après cette revaccination, le cobaye n° 1 présente une réaction nécrotique à la tuberculine ; le cobaye n° 2 ne réagit pas.

Trois mois après cette revaccination, ces réactions restent inchangées chez ces deux animaux.

Ceux-ci sont à ce moment éprouvés par instillation oculaire de 0 milligr. 1 de la souche bovine Vallée ainsi que 2 témoins.

Ils sont tous sacrifiés deux mois après.

Les prémunis ont des ganglions sous-maxillaires et cervicaux moins volumineux que ceux des témoins et non caséeux. Leur rate est indemne, alors que celle des témoins a 7 à 8 tubercules.

Les cobayes revaccinés par la voie buccale à une ou deux reprises un, deux et trois mois après la première vaccination, paraissent se comporter comme ceux qui n'ont subi que la première prémunition au moment de leur naissance. Leurs lésions ganglionnaires sont souvent moins prononcées que celles des témoins. Leurs lésions spléniques sont toujours plus rares.

#### PRÉMUNITION DU COBAYE NOUVEAU-NÉ PAR INGESTION DE GROSSES QUANTITÉS DE BCG.

Nous avons essayé de voir si, en augmentant dans de très fortes proportions la quantité de BCG ingérée par le cobaye nouveau-né, on pourrait renforcer son immunité antituberculeuse.

EXPÉRIENCE. — 6 cobayes nouveau-nés sont prémunis par quinze ingestions de 1 centigramme de BCG, effectuées tous les deux jours dans le mois qui suit leur naissance.

Un mois après la fin des ingestions, ils sont éprouvés à la tuberculine par injection intradermique de 0 c. c. 1 de tuberculine brute. Ils réagissent positivement par un épaississement de la peau, certains par un léger érythème.

Ils sont infectés à ce moment, ainsi que 4 témoins, par instillation oculaire de 0 milligr. 1 de la souche bovine Vallée.

Deux mois après cette infection, ils sont tous sacrifiés.

Les ganglions cervicaux et sous-maxillaires des cobayes prémunis sont, en général, moins volumineux que ceux des témoins, 2 prémunis n'ont aucune lésion sur la rate, un à 4 tubercules sur cet organe, 2 ont de nombreux tubercules sur cet organe. Chez les cobayes témoins, 1 n'a aucune lésion sur les organes, 2 ont 4 à 5 tubercules sur la rate et quelques tubercules sur les poumons, 1 a de nombreux tubercules sur la rate et les poumons.

Chez les cobayes prémunis par 15 ingestions de 1 centigramme de BCG, il y a donc moins de tendance à la généralisation des lésions aux divers organes que chez les animaux témoins, mais la résistance conférée par cette absorption massive de BCG ne paraît pas supérieure à celle donnée par ingestion d'une quantité plus minime.

#### PRÉMUNITION DU LAPIN NOUVEAU-NÉ PAR INGESTION DE SIX FOIS 1 CENTIGRAMME DE BCG.

EXPÉRIENCE. — 9 petits lapins, âgés de dix jours, absorbent par la voie buccale, six jours de suite, 1 centigramme de BCG, soit en tout 6 centigrammes. Ils sont éprouvés à intervalles réguliers par injection intraveineuse de 1/20 de centimètre cube de tuberculine brute.

Si l'on ne tient compte que des élévations thermiques égales ou supérieures à 1° qui se sont produites dans les heures qui ont suivi cette injection, 1 lapin a réagi positivement un mois après la vaccination; 2 lapins ont réagi au bout de deux mois, 1 au bout de deux mois et demi, 1 au bout de trois mois et demi et 1 au bout de cinq mois et demi.

Mais si l'on prend aussi en considération des élévations thermiques comprises entre 0°8 et 1°, 2 autres lapins ont réagi à la tuberculine après un mois et deux mois.

Le neuvième lapin est mort d'infection intercurrente après sept mois d'observation sans avoir réagi positivement.

Sur 9 jeunes lapins vaccinés avec le BCG à la naissance par la voie buccale, 8 animaux ont réagi positivement à la tuberculine (6 fortement, 2 faiblement). Ces réactions allergiques ont apparu dans un délai compris entre un mois et cinq mois et demi.

5 de ces lapins, pris parmi ceux qui ont réagi le plus précocement, ont été éprouvés trois mois après l'ingestion de BCG, ainsi que 4 témoins, par inoculation intraveineuse de 0 milligr. 0001 de la souche bovine Cernay.

Un mois après, un vacciné et 1 témoin meurent. Chacun d'eux présente 4 ou 5 granulations sur chaque poumon.

Quelques jours plus tard, 1 vacciné et 1 témoin meurent. Le vacciné ne présente pas de lésions pulmonaires. Le témoin a de nombreux tubercules sur les poumons.

Deux mois après l'épreuve virulente, les 3 vaccinés et les 2 témoins qui survivent sont sacrifiés.



Parmi les premiers, 2 n'ont que 3 à 5 tubercules sur chaque poumon, 4 à de nombreux tubercules pulmonaires. Chez les témoins, l'un a 7 ou 8 tubercules sur les poumons, l'autre de nombreuses granulations pulmonaires et 2 tubercules rénaux.

Cette expérience montre combien peut être long le délai qui s'écoule entre la prémunition au BCG par la voie buccale et la manifestation de l'allergie. Chez tous les animaux qui avaient été sensibilisés à la tuberculine, la tuberculose d'épreuve a évolué sensiblement comme celle des animaux témoins. Cependant, d'une façon générale, les lésions ont été un peu moins marquées chez les prémunis que chez les témoins. Ces résultats peuvent s'expliquer par la sévérité de la voie d'épreuve employée.

#### SUR L'INFLUENCE DU FRACTIONNEMENT DES DOSES DE VACCIN DANS LA PRÉMUNITION ANTITUBERCULEUSE PAR LE BCG.

Nous avons montré, avec A. Calmette et A. Boquet (1), que des injections sous-cutanées, répétées dix fois tous les deux jours, de 2 milligrammes de BCG prémunissent mieux les cobayes contre une infection tuberculeuse expérimentale que l'injection unique de 20 à 30 milligrammes de ce bacille-vaccin.

Plus récemment, J. Beerens (2) a vu dans notre laboratoire que des injections sous-cutanées à des cobayes, répétées vingt ou trente fois tous les deux jours, de 0 milligr. 01 de BCG, donnent à ces animaux une résistance à l'infection tuberculeuse que l'injection en une seule fois de 0 milligr. 2 ou 0 milligr. 3 est incapable de leur conférer. Dix injections de la même dose ne sont pas suffisantes pour obtenir le même résultat.

A la suite de ces constatations, nous avons cherché à nous rendre compte si l'ingestion répétée par des cobayes de doses fractionnées d'une quantité déterminée de BCG, provoque chez ces animaux l'apparition d'une allergie et d'une résistance à l'infection tuberculeuse plus prononcées que l'ingestion en une seule prise de ces germes.

(1) Ces *Annales*, 36, septembre 1922, p. 625.

(2) *C. R. Soc. de Biol.*, 112, 26 janvier 1933, p. 120.

Nous avons procédé, dans ce but, à l'expérience suivante :

EXPÉRIENCE. — 12 cobayes adultes ingèrent en une seule fois 5 centigrammes de BCG. 12 autres cobayes du même âge absorbent par la voie buccale, à cinq reprises, tous les deux jours, 1 centigramme de BCG, soit en tout 5 centigrammes.

Deux mois après ces ingestions, la sensibilité à la tuberculine de ces animaux est recherchée par injection intradermique de 0 c. c. 01 de tuberculine brute.

Dans le lot des cobayes qui ont ingéré les 5 centigrammes de BCG en une seule fois, il y a trois réactions nettes (25 p. 100), trois réactions légères (25 p. 100) et six réactions nulles (50 p. 100). Par contre, dans le lot des cobayes qui ont ingéré la même quantité de BCG en cinq prises espacées on constate six réactions nettes (50 p. 100), trois réactions légères (25 p. 100) et trois réactions nulles (25 p. 100).

Tous ces animaux sont alors éprouvés par instillation oculaire de 0 milligr. 1 de la souche bovine Vallée. Ils sont tous sacrifiés six semaines après.

Les cobayes témoins présentent, avec des lésions ganglionnaires sous-maxillaires et cervicales, de nombreux tubercules sur la rate. Chez les cobayes qui ont ingéré le BCG, les lésions spléniques sont un peu moins prononcées que chez les témoins, spécialement chez ceux qui ont absorbé les 5 centigrammes de BCG en cinq prises de 1 centigramme. Dans ce dernier lot, 4 cobayes ont à ce moment leur rate presque indemne de toute lésion.

Il ressort de cette expérience, que nous avons d'ailleurs répétée avec des résultats analogues, que lorsqu'une dose déterminée de BCG est ingérée en plusieurs fractions, les cobayes ainsi prémunis présentent une proportion de réactions positives à la tuberculine plus élevée et une résistance à une infection tuberculeuse d'épreuve un peu plus marquée que les animaux qui ont ingéré la même quantité de BCG en une seule fois.

A la suite de ces résultats favorables au fractionnement des doses de BCG employées dans la prémunition, nous avons essayé d'augmenter la résistance conférée au cobaye par absorption de ce germe par la voie buccale, en faisant à cet animal une série de dix injections sous-cutanées de 0 milligr. 01 de BCG.

Nous avons prémuni des cobayes nouveau-nés par ingestion de BCG à une ou deux reprises, puis nous leur avons injecté dix fois tous les deux jours, 0 milligr. 01 de BCG.

EXPÉRIENCE. — 6 cobayes nouveau-nés ingèrent, neuf jours de suite, à partir du quatrième ou sixième jour après leur naissance, 5 milligrammes de BCG, soit au total 4 centigr. 5.

Un meurt le dernier jour de l'ingestion. On trouve des bacilles acido-résistants dans son foie.

Six semaines après cette ingestion, un seul cobaye réagit à la tuberculine par un léger épaissement de la peau.

Trois mois après cette ingestion, tous réagissent à l'intradermo-réaction à la tuberculine, 3 par une réaction nécrotique, 2 par un épaissement cutané.

On leur fait ingérer à ce moment, quatre jours de suite, 1 centigramme de BCG, au total 4 centigrammes.

Deux mois après cette revaccination, tous les cobayes réagissent à l'intradermo-réaction par une réaction nécrotique, sauf 1 qui ne présente qu'un épaissement de la peau.

Quatre mois après la revaccination, les réactions sont moins fortes (une réaction nécrotique, un épaissement avec léger érythème et trois épaissements).

Ces cobayes reçoivent alors, tous les deux jours, dix injections sous-cutanées de 0 milligr. 01 de BCG.

3 meurent avant l'épreuve virulente qui est faite, deux mois après la revaccination par voie sous-cutanée, par instillation oculaire de 0 milligr. 1 de la souche bovine Vallée. 3 cobayes témoins du même âge sont éprouvés de la même façon.

Tous ces animaux sont sacrifiés deux mois après l'infection virulente.

Chez les cobayes prémunis, les ganglions sont sensiblement du même volume que chez les témoins. *Les premiers présentent une rate indemne de toute lésion, alors que les cobayes témoins ont 8 à 10 tubercules sur cet organe.*

EXPÉRIENCE. — 7 cobayes nouveau-nés ingèrent, six jours de suite, à partir du troisième jour après leur naissance, 6 centigrammes de BCG. Six semaines après, 6 d'entre eux reçoivent, dix jours de suite, dix injections sous-cutanées de 0 milligr. 01 de BCG. 1 est conservé comme témoin.

Six semaines après cette série d'injections sous-cutanées, ce dernier cobaye, de même que les 6 qui ont reçu les injections sous-cutanées de BCG, sont éprouvés avec 4 cobayes neufs du même âge par instillation oculaire de 0 milligr. 01 de la souche bovine Vallée.

Ils sont tous sacrifiés six semaines après l'épreuve virulente.

Il n'y a pas de grandes différences entre les lésions ganglionnaires des cobayes prémunis et celles des témoins. Les ganglions des prémunis sont, en général, un peu plus volumineux, mais moins nombreux que ceux des témoins.

*Pas un seul des 6 cobayes prémunis par la voie buccale, puis par la voie sous-cutanée, n'a de lésions sur la rate. Les cobayes témoins ont 10 à 20 tubercules sur leur rate*



Le cobaye qui avait ingéré à sa naissance le BCG, mais qui n'avait pas reçu les injections sous-cutanées de bacille-vaccin, a 2 tubercules sur la rate et se classe ainsi entre les cobayes qui ont reçu la série d'injections sous la peau et les cobayes témoins.

Ces expériences montrent que l'adjonction à l'immunisation par la voie buccale de dix injections sous-cutanées de BCG renforce d'une façon très nette la résistance conférée à cet animal par l'absorption préalable de ce germe.

#### CONCLUSIONS.

Chez les cobayes nouveau-nés, prémunis par ingestion de 4 à 6 centigrammes de BCG et chez ceux prémunis de la même façon et revaccinés par la même voie avec les mêmes doses, l'infection virulente d'épreuve réalisée par voie oculaire avec une quantité faible d'un bacille virulent (0,1 ou 0 milligr. 01) évolue d'une façon différente que chez les animaux témoins du même âge.

Chez les vaccinés, l'évolution de l'infection est retardée et en général moins prononcée.

Dans la plupart des cas, chez les prémunis, les ganglions sous-maxillaires et cervicaux infectés sont plus rares et les tubercules spléniques moins nombreux.

La résistance relative conférée au cobaye nouveau-né par absorption préalable de BCG peut donc être mise en évidence, aussi bien vis-à-vis d'une infection d'épreuve réalisée par la voie oculaire que vis-à-vis d'une infection par la voie digestive.

Par contre, chez le lapin nouveau-né prémuni par la voie buccale et éprouvé par la voie sanguine, quoique avec une dose faible de bacilles virulents, les lésions sont sensiblement les mêmes chez les vaccinés et chez les témoins. On peut attribuer cet échec à la sévérité de la voie d'infection employée, puisqu'il n'en est pas de même lorsque les animaux sont éprouvés par la voie digestive.

Il ressort de nos expériences qu'il y a tout intérêt, pour augmenter l'efficacité de la prémunition antituberculeuse par le BCG, à faire absorber une dose déterminée de ce germe en plusieurs prises fractionnées, par exemple 5 centigrammes en

cinq prises de 1 centigramme tous les deux jours. On obtient ainsi une proportion de réactions positives à la tuberculine plus élevée et une résistance à une infection d'épreuve plus prononcée que si la même quantité de BCG (5 centigrammes) est ingérée en une seule fois.

Si on fait suivre la vaccination du cobaye nouveau-né par absorption de 4 à 6 centigrammes de BCG d'une série de dix injections sous-cutanées de 0 milligr. 01 de ce germe, effectuées un mois après, on obtient un renforcement très considérable de la résistance conférée à cet animal par la première vaccination.

D'une façon générale, on peut conclure de cette étude qu'il y a plus intérêt, pour donner au BCG sa pleine efficacité, à multiplier les prises qu'à augmenter les doses (1).

D'après tout ce que nous savons sur le mécanisme de l'infection bacillaire, on peut supposer que les absorptions ou les réinfections successives de BCG agissent en favorisant la multiplication de ce germe dans le système lymphatique où il tend à se généraliser, comme l'ont montré Calmette et Guérin, et qu'elles augmentent ainsi ses effets.

(1) C'est ce qui ressort également des expériences que Ch. Duprez vient de publier (*C. R. Soc. de Biol.*, 117, p. 832).

## ANALYSE SÉROLOGIQUE DES DIFFÉRENTES FRACTIONS LIPOIDIQUES DU BCG

par E. CHARGAFF et W. SCHAEFER.

(*Institut Pasteur.*  
*Laboratoires de Recherches sur la tuberculose.*)

L'un de nous (1) a récemment étudié la séparation des lipides du BCG (phosphatide, graisse et cire) selon la méthode de R. J. Anderson (2) et les propriétés chimiques de ces fractions. Sauf en ce qui concerne les cires, la composition chimique des lipides de ce bacille avirulent ne diffère pas sensiblement de celle des lipides d'autres bacilles acido-résistants (3). Il nous a paru intéressant d'étudier les propriétés sérologiques de ces fractions, et de déterminer, en particulier, si les lipides du BCG sont un haptène ou un antigène vrai, à quelle fraction cette propriété appartient et si cette fraction est active par elle-même ou par quelque impureté adhérente.

### I. — PHOSPHATIDE.

Le phosphatide étudié par nous est une préparation pure, obtenue selon les méthodes décrites dans le travail cité. C'est une poudre jaunâtre, qui entre en fusion à 115°. Il contient 1,6 p. 100 de phosphore et 0,4 p. 100 d'azote, et ne donne pas les réactions des protéïdes. Nous n'avons pas obtenu de réactions de floculation avec ce phosphatide et un sérum anti-BCG de cheval qui, cependant, flocculait très bien avec différentes préparations de polyholosides du même bacille préparées par

(1) E. CHARGAFF. *Zeitschr. physiol. Chem.*, **217**, 1933, p. 415.

(2) *Journ. biol. Chem.*, **74**, 1927, p. 525.

(3) Pour la bibliographie sur les propriétés sérologiques des lipides du bacille tuberculeux, nous renvoyons au résumé de E. WITTEBSKY et R. KLINGENSTEIN, *Ergebnisse der gesamten Tuberkuloseforschung*, **5**, 1933, p. 425, et à la publication récente de K. PEDERSEN-BJERGAARD. *Zeitschr. Immunitätsforsch.*, **82** 1934, p. 258.

nous et sur lesquelles nous reviendrons (1). C'est pourquoi nous avons employé la réaction de fixation du complément.

Les sérums employés pour ces recherches provenaient de chevaux immunisés par plusieurs injections intraveineuses de BCG. Pour l'usage, le phosphatide était émulsionné à 1 p. 1.000 dans de l'eau physiologique.

Nos expériences ont montré que le phosphatide est un véritable antigène, car non seulement il donne une réaction de fixation, mais aussi il produit des anticorps antiphosphatidiques chez les lapins immunisés par six injections de 1 milligramme par voie veineuse.

Quant à la spécificité de cet antigène, elle est tout à fait comparable à celle de l'antigène méthylique de Boquet et Nègre préparé à partir de bacilles humains et bovins; son activité est cependant un peu plus faible.

Une comparaison des deux antigènes vis-à-vis de plusieurs sérums de malades a donné des résultats identiques. En outre, le phosphatide du BCG réagit avec un sérum de lapin traité par des injections d'une émulsion aqueuse d'antigène méthylique et inversement l'antigène méthylique a fixé le sérum d'un lapin traité par des injections des phosphatides du BCG. Aucun de ces antigènes, par contre, n'a réagi avec des sérums antiprotéidiques tuberculeux (2), ni avec des sérums normaux de cheval ou de lapin. Le phosphatide du BCG réagit comme l'antigène méthylique non seulement avec des sérums anti-BCG, mais aussi avec les sérums anti-humains et anti-aviaires expérimentaux (3). Les propriétés antigènes de ces phosphatides étant ainsi confirmées, nous nous sommes demandé si l'activité qu'ils manifestent leur appartient en propre ou si elle est liée à la présence d'une autre substance. On pouvait penser, en effet, qu'une substance hydrosoluble, un polyholoside, par exemple, adhère au phosphatide ou qu'elle en est libérée au cours de la préparation de l'émulsion aqueuse. Pour répondre à cette question, nous avons fait plusieurs expériences dont nous donnons l'exemple suivant :

(1) Voir, par contre, C. A. DOAN. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 26, 1929, p. 672.

(2) W. SCHAEFER et G. SANDOR. *Ces Annales*, 53, 1934, p. 72.

(3) Ces expériences ont été entreprises en collaboration avec le Dr A. Beck qui n'a pas pu les continuer par suite de son départ.



EXPÉRIENCE. — 15 milligrammes de phosphatide ont été émulsionnés par petites fractions dans 15 cent. cubes d'eau physiologique. 5 cent. cubes de cette émulsion ont été fortement centrifugés. Le résidu sec de centrifugation pesait 4 milligr. 9. La quantité dissoute était par conséquent très faible. Néanmoins le pouvoir fixateur de la solution centrifugée était très net et presque aussi fort que celui de l'émulsion phosphatidique totale (comparer, tableau I, colonnes *a* et *b*). Il s'ensuit que de très faibles quantités suffisent pour donner aux solutions une activité sérologique et que la plus grande partie de la substance dispersée dans le milieu sous forme de flocons, séparables par centrifugation, par contre n'intervient d'aucune façon.

TABLEAU I.

DILUTIONS d'antigène	<i>a</i> ÉMULSION du phosphatide du BCG à 1 p. 1.000	<i>b</i> LIQUIDE décanté après centrifugation de <i>a</i>	<i>c</i> 1 <sup>er</sup> EXTRAIT aqueux du résidu	<i>d</i> 2 <sup>e</sup> EXTRAIT aqueux du résidu	<i>e</i> 3 <sup>e</sup> EXTRAIT aqueux du résidu	<i>f</i> ÉMULSION du résidu lavé
1 : 1	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1 : 2	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1 : 4	++++	++++	++++	++++	++	++++
1 : 8	++++	++++	++++	++++	—	++++
1 : 16	++++	++++	++++	—	—	++
1 : 32	++++	++++	+	—	—	—
1 : 64	++++	++++	—	—	—	—
1 : 128	++++	++++	—	—	—	—
1 : 256	—	—	—	—	—	—
<i>Les mêmes antigènes traités dix fois par l'éther :</i>						
1 : 1		—	—	—	—	
1 : 2		—	—	—	—	
1 : 4		—	—	—	—	
1 : 8		—	—	—	—	
1 : 16		—	—	—	—	

Une autre partie de l'émulsion (5 cent. cubes) a été centrifugée, le culot fut émulsionné dans 5 cent. cubes d'eau physiologique. On centrifugea de nouveau, et on remit le culot en émulsion dans une nouvelle quantité d'eau physiologique. On répéta cette extraction aqueuse du culot encore une fois et on émulsionna finalement celui-ci dans 5 cent. cubes d'eau physiologique. L'émulsion originale, le liquide décanté après centrifugation, les trois extraits aqueux du culot et l'émulsion finale du culot ont été examinés au point de vue de leur pouvoir antigène. (Tableau I, partie supérieure.) Ensuite les extraits aqueux ont été traités dix fois de suite par l'éther en les agitant pendant assez longtemps dans une ampoule à décantation, puis on chassa par le vide les traces d'éther et on détermina leur activité sérologique (partie inférieure du tableau I). Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau ci-dessus. Les témoins des divers antigènes n'y sont pas mentionnés. L'émulsion originale et le liquide décanté après centrifugation (*a* et *b*) étaient empêchants jusqu'à la dilution au quart, par contre les extraits successifs *c*, *d*, *e* et l'émulsion du résidu n'ont montré aucun pouvoir anticomplémentaire.

L'expérience montre : 1° que l'émulsion originale et le liquide décanté après centrifugation ont presque le même pouvoir antigénique ; 2° que tous les extraits aqueux du résidu ont acquis aussi une activité antigénique et que l'émulsion finale du résidu lavé possède encore un pouvoir fixateur important ; 3° que les extraits aqueux ont perdu toute leur activité sérologique par des lavages à l'éther, dix fois répétés. (Nous avons dû répéter ces lavages à l'éther aussi souvent, parce qu'après trois lavages les solutions se montraient encore faiblement actives). Nous pouvons donc conclure que la substance antigène ne peut être ni une impureté hydrosoluble du phosphatide, ni une substance hydrosoluble libérée du phosphatide. Car, dans ce cas, le résidu aurait dû être inactivé après ces lavages répétés avec l'eau. Il paraît beaucoup plus probable que le phosphatide est lui-même l'antigène qui est dissous en très petite quantité dans l'eau — probablement sous une forme colloïdale — et peut en être extrait, comme nous avons vu, par l'éther.

Une autre question est de savoir si le phosphatide peut être considéré comme un lipide rigoureusement homogène au point de vue sérologique ou s'il est un mélange de différents lipides dont un seul serait le véritable antigène. L'analyse des phosphatides des bacilles acido-résistants effectuée par R. J. Anderson et ses collaborateurs (1), avait montré que ces phosphatides sont composés d'un polyholoside phosphoré et d'une série d'acides gras solides et liquides formant des esters avec celui-ci. Les acides gras liquides, parmi lesquels se trouve l'acide phthioïque  $C^{26}H^{52}O^2$ , sont particulièrement intéressants au point de vue chimique. On peut s'imaginer la constitution des phosphatides de la façon suivante : ou une seule molécule du polyholoside est estérifiée avec toute la série des différents acides gras, trouvés dans le phosphatide, ou le phosphatide est un mélange de différents esters du polyholoside dans chaque molécule duquel les groupements hydroxyles ne sont estérifiés qu'avec un seul ou deux acides gras. Dans ce dernier cas, il serait possible qu'une seule fraction du phosphatide, par exemple l'ester qui contient les acides gras liquides spécifiques,

(1) Voir E. CHARGAFF. *Handb. d. biol. Arbeitsmeth.*, 12, 22, 1933, p. 109.

soit l'antigène actif au point de vue sérologique. Pour élucider ce problème, nous avons opéré comme il suit.

EXPÉRIENCE. — 21 milligr. 5 de phosphatide ont été triturés dans de petites portions d'alcool méthylique (2 cent. cubes) dix fois successivement. Après quelque temps, les flocons non dissous ont été séparés par centrifugation et la solution a été portée à 20 cent. cubes exactement. Le résidu non dissous pesait 17 milligr. 5. 1 cent. cube de la solution contenait donc 0 milligr. 2 de la substance. Le résidu non dissous (17 milligr. 5) fut traité de nouveau par 5 cent. cubes d'alcool méthylique en chauffant légèrement. On centrifugea après quelque temps et le liquide décanté fut porté à 5 cent. cubes. Le résidu insoluble de cette deuxième opération pesait 16 milligr. 5. La deuxième solution en alcool méthylique avait donc la même concentration que la première. Ces deux solutions ont été étudiées comparativement au point de vue de leur activité sérologique.

0 c. c. 25 de dilutions décroissantes des deux solutions ont été mélangées avec 0 c. c. 25 d'alexine diluée au 1/15 et 0 c. c. 25 de sérum anti-BCG dilué au 1/5 et laissés pendant une heure à l'étuve. Puis on ajouta 0 c. c. 5 d'un mélange en parties égales de sérum hémolytique (cinq doses minima lysantes) et de globules de mouton à 5 p. 100. Le résultat de la réaction de fixation est représenté dans le tableau ci-dessous sans les témoins des antigènes qui n'ont montré aucun pouvoir empêchant aux dilutions employées.

TABLEAU II.

DILUTION DES ANT.GÈNES	RÉACTION DE FIXATION OBTENUE AVEC 0 C.C. 25 D'ALEXINE AU 1/15, 0 C.C. 25 DE SÉRUM ANTI-BCG AU 1/5 ET 0 C.C. 25 DE DOSES DÉCROISSANTES DES ANTIGÈNES SUIVANTS :	
	<i>a</i> Solution du phosphatide dans l'alcool méthylique	<i>b</i> Solution du résidu du phosphatide dans l'alcool méthylique
1 : 10. . . . .	++++	++++
1 : 20. . . . .	++++	++++
1 : 40. . . . .	++++	++++
1 : 80. . . . .	++++	++++
1 : 160. . . . .	++++	++
1 : 320. . . . .	—	—

Le tableau montre que les deux solutions du phosphatide dans l'alcool méthylique possèdent presque la même activité. Le traitement répété du phosphatide par l'alcool méthylique n'a donc pas permis d'obtenir des fractions d'une activité sérologique différente. Tout au contraire, la solubilité de notre préparation ainsi que son activité sérologique sont restées les

mêmes. On en pourrait conclure que la fraction phosphatidique est homogène — au moins au point de vue sérologique — et que c'est elle-même qui représente l'antigène.

La solubilité du phosphatide dans l'alcool méthylique est de 0 milligr. 2 par centimètre cube à 22°. Comme 0 c. c. 25 d'une solution au 1/160 sont encore suffisants pour donner une réaction de fixation, la quantité minima active du phosphatide comme antigène fixateur est de 0 milligr. 0003.

## II. — GRAISSE.

La graisse bacillaire étudiée (1) était une substance molle, jaunâtre, fondant à 41°. Son indice d'iode était 40,7, l'indice de saponification 220,8, l'indice d'acides libres 78,8. Une émulsion à 1 p. 1.000 en eau physiologique employée comme antigène a montré une activité sérologique quarante fois plus faible que celle du phosphatide. Étant donné que les graisses contiennent 2 à 3 p. 100 de phosphatides en se basant sur leur contenu en phosphore, l'activité sérologique de la graisse peut être attribuée à cette impureté.

## III. — CIRE.

La cire bacillaire, la seule fraction du BCG présentant le phénomène de l'acido-résistance, formait une poudre blanche fondant à 48°. Elle ne contenait que des traces minimales de phosphore et d'azote et ne donnait aucune réaction des protéides. Il était extrêmement difficile à obtenir des suspensions homogènes de la cire et nous n'avons pas réussi, même avec la méthode de H. Kraut et H. Burger (2), à préparer une émulsion stable de ce produit. Dans nos expériences, la cire s'est montrée totalement inactive dans la déviation du complément.

## RÉSUMÉ.

Parmi les fractions lipoidiques du BCG (phosphatide, graisse, cire), le phosphatide seul a fait preuve d'activité anti-

(1) E. CHARGAFF. *Zeitschr. Physiol. Chem.*, **217**, 1933, p. 115.

(2) *Zeitschr. Physiol. Chem.*, **209**, 1932, p. 49.



génique *in vitro* et *in vivo*. Cette activité ne peut pas être attribuée à une impureté soluble dans l'eau ou dans l'alcool, qui adhérerait au phosphatide. Elle appartient au phosphatide lui-même et se manifeste encore d'une façon évidente lorsqu'on emploie une dose minime (0 milligr. 0003) de ce produit (1).

(1) L'un de nous (E. Ch.) tient à exprimer sa sincère gratitude à la Fondation Rockefeller pour la subvention qu'elle lui a accordée pour ce travail.

**SUR LA VARIATION MICROBIENNE  
OBSERVÉE DANS UNE SOUCHE DE *B. DYSENTERIÆ*  
(GROUPE GAY-HARRIS) :  
AVEC QUELQUES OBSERVATIONS NOUVELLES  
SUR LA VALEUR COMPARATIVE DES VACCINS  
SOLUBLES ET INSOLUBLES  
EN IMMUNOLOGIE**

par ARTHUR COMPTON.

(*Laboratoire Municipal d'Alexandrie, Égypte.*)

Au cours de mes recherches sur la valeur du bactériophage dans le traitement de la dysenterie bacillaire (Compton, 1929), j'ai entrepris l'étude systématique des microbes isolés des selles de malades suspects de dysenterie bacillaire aiguë (1). C'est ainsi que j'ai pu isoler un bacille assez curieux différent du Shiga, du Flexner, du Hiss (y compris le Sonne) et du Strong. Il poussait tantôt en colonies opaques sur gélose avec une belle fluorescence vert doré, vues par réfraction, tantôt en colonies translucides sans fluorescence (fig. 1).

Je me rendis compte que j'étais en présence d'un cas de « dissociation » microbienne et, par des expériences d'agglutination croisée et d'identification par les réactions bio-chimiques, j'étudiai le phénomène qui, de prime abord, ne se présentait pas comme les transformations « smooth » et « rough » des auteurs anglais (Arkwright, 1921 ; Todd, 1928) qui était d'ailleurs à l'ordre du jour vers ce temps-là.

Notre microbe se rapprochait par ses réactions bio-chimiques du germe décrit par Macé (1913) sous les noms de Gay et

(1) 100 souches isolées à Alexandrie pendant 1927-1929 se répartissaient d'après la fermentation des sucres, y compris des producteurs et des non-producteurs d'indol, comme suit : groupe Hiss, 40,2 p. 100 ; groupe Shiga-Schmitz, 21 p. 100 ; groupe Flexner, 16,3 p. 100 ; groupe Gay-Harris, 10,3 p. 100 ; groupe Saïgon, 4,5 p. 100 ; et d'autres, 7,5 p. 100.

Duval (1903), qui l'avaient isolé des selles de « summer diarrhoea » d'enfants en Amérique; nous le rencontrâmes plus tard dans la littérature sous le nom de Harris (Stitt, 1929).

C'est un cocco-bacille, Gram négatif, immobile, ne fermentant pas le lactose, mais fermentant avec production d'acide seulement, le glucose, le maltose, le saccharose, la mannite, la dulcité, et faiblement la dextrine. La gélatine n'est pas liquéfiée. La peptone est attaquée avec production d'indol. Cette dernière donnée manque dans les descriptions que j'ai pu consulter du bacille de Gay et du bacille de Harris. Bergey (1926) n'en parle



FIG. 1. — Deux variantes opaque (O) et semi-transparente (T) d'un *B. dysenteriae* (groupe Gay-Harris) isolé d'un cas de dysenterie aiguë à Alexandrie (Egypte); X10. I indique un processus de transformation O vers T.

pas dans son manuel classique des espèces bactériennes.

Si notre microbe n'est pas identique aux leurs, il appartient tout au moins au même groupe général que ceux de Gay et de Harris. Nous proposons de l'appeler provisoirement *B. dysenteriae alexandrinus*.

Pour nous assurer d'une façon certaine que les deux colonies opaques O et translucides T — la colonie T dérivant de la colonie O en culture artificielle (par repiquage d'une colonie O pure dans le bouillon, puis par isollements sur gélose tous les trois ou quatre jours) — représentaient la même entité microbienne, c'est-à-dire qu'elles étaient issues de la même souche,

nous avons préparé des antisérums de lapin en vue d'une expérience d'agglutination croisée. Nous avons constaté que le sérum anti-O agglutinait O et T, lesquels étaient également agglutinés par le sérum anti-T. Il s'agissait d'un cas authentique de dissociation microbienne.

Ce point établi, nous avons entrepris une longue série d'expériences pour élucider la question de savoir si la colonie T, qui nous paraissait plus ou moins stable, peut faire retour à la colonie O (instable).

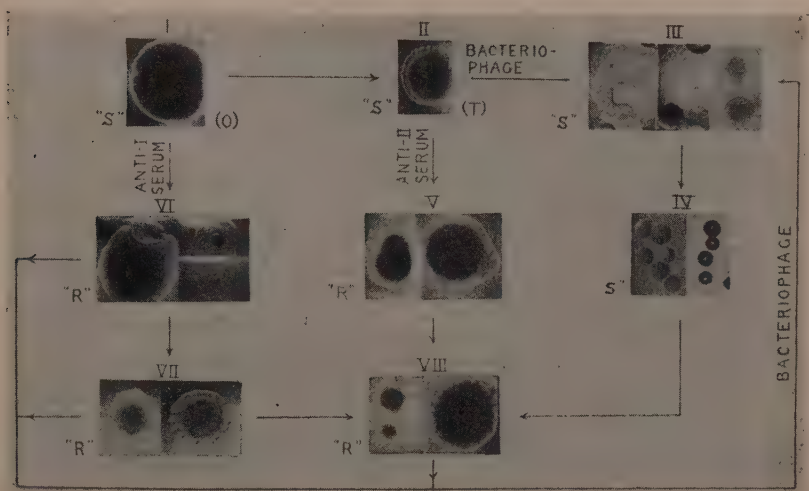


FIG. 2. — Schéma montrant quelques cycles de transformation observés dans la dissociation microbienne d'un *B. dysenteriae* (Groupe : Gay-Harris).

Sans avoir pu résoudre la question, nous avons été conduit dans des voies nouvelles, qui motivent cette communication.

#### PRODUCTION D'AUTRES VARIANTES.

Dans cet ordre d'idées, nous avons cultivé la variante T (variante II de la figure 2) en présence de sérum anti-T, pensant, d'après quelques travaux signalés dans la littérature sur la dissociation microbienne (Hadley. 1927), que les anticorps T présents dans le sérum auraient peut-être comme effet de régénérer la variante O (variante I, fig. 2).



Rien de tout cela n'arriva ; au contraire, on observa la formation d'un nouveau type de colonies quand la culture en sérum était ensemencée sur gélose. Ce phénomène se produisait quand on cultivait la variante T en bouillon-sérum à 10 p. 100, et il ne se manifestait qu'après douze semaines à l'étuve à 37°. Quelques colonies sèches se développaient alors à la surface de la gélose, disséminées parmi des colonies humides T. C'est la variante V de la figure 2.

Puis, nous avons étudié l'influence du bactériophage sur la culture des colonies T. En présence de cet agent, nous avons vu apparaître deux nouvelles variantes tout à fait différentes des trois formes décrites jusqu'alors. Ce sont les variantes III et IV du schéma (fig. 2). En bouillon, la première de ces deux variantes donne une culture d'un trouble homogène, ce qui tend à lui assigner le type « smooth » ou S ; la deuxième donne une culture floculante avec dépôt et liquide surnageant trouble, ce qui tend à la ranger parmi les types S et R.

Il est à remarquer que les variantes III et IV sont instables dans les milieux ordinaires, se transformant assez vite en variante VIII par culture en bouillon. Nous observions donc quatre nouveaux dérivés de la colonie originelle T que l'on avait considérée comme une forme stable (Compton, 1932).

D'autre part, nous avons cultivé la colonie originelle, instable, O, en présence de son anti-sérum, et nous avons observé le développement d'une nouvelle variante VI sèche et rugueuse. Sa formation se présente comme une sorte d'invagination de la colonie mère vue dans la double colonie à gauche de la variante VI (fig. 2). Il a fallu un contact de douze semaines avec le sérum à 25 p. 100 pour réaliser la transformation I → VI, et six semaines avec le même sérum à 50 p. 100. Cette forme, très instable, ne peut être conservée qu'en culture dans le sérum anti-O. Elle passe vite aux formes VII et VIII par culture en bouillon.

Chacune de ces huit formes de colonies, dont sept sont des dérivés de la colonie originelle O, se distingue d'abord par l'aspect des colonies sur gélose. Le tableau I résume leurs principaux caractères.

TABLEAU I.

VARIANTE	ASPECT DES COLONIES SUR GÉLOSE
I . . . . .	Opagues, grandes, rondes, avec fluorescence vert-orange; bordure nette avec souvent des invaginations de transformation vers II. Au microscope, amas lenticulaires dans la colonie (Compton, 1932).
II . . . . .	Transparentes, moins grandes que I; bordure claire, d'abord planes, puis ondulées.
III. . . . .	Visqueuses, irrégulières, blanchâtres d'abord, puis centre gris avec pourtour surélevé, hyalines.
IV. . . . .	Relativement petites, rondes, transparentes, surélevées.
V . . . . .	Colonies semi-opaques, grandes, surface sèche; centre gris, pourtour plus clair; périphérie aplatie, transparente; bord surélevé.
VI . . . . .	Colonies petites ou grandes, grisâtres, rugueuses, surélevées, bordure sinueuse. Au microscope, filaments entrelacés.
VII . . . . .	Colonies petites ou grandes, grisâtres, à trois zones: centre surélevé avec ombilic central; pourtour plus clair; périphérie transparente à bords sinueux.
VIII . . . . .	Colonies petites ou grandes, grisâtres; centre légèrement surélevé; bordure transparente, sinueuse.

Les variantes III, IV, VI et VII, produites sous l'influence soit du bactériophage, soit de l'anti-sérum, sont peu stables, et se transforment à la longue, comme l'indique le schéma de la figure 2, variante VIII, dernier terme auquel nous sommes arrivé jusqu'à présent. Il est fort probable qu'il existe d'autres variantes.

L'intérêt de ce travail tient surtout à ce que nous avons pu suivre chaque étape figurée sur le schéma et observer quelques cycles bien définis dans la mutation héréditaire des microbes, comparables aux cycles de la synthèse et de la transformation d'un composé chimique et de ses dérivés.

Outre les différences dans l'aspect des colonies nettement reproduites par les photographies de la figure 2, nous avons pu aussi distinguer souvent les variantes par la culture en bouillon, la sensibilité au NaCl, la morphologie, les réactions bio-chimiques, bactériophagiques, la virulence et les réactions d'immunité.

CULTURE EN BOUILLON. — La culture en bouillon de diverses variantes nous fournit d'importants renseignements sur leur nature « rough » ou « smooth ». La forme smooth (ou S) se développe avec production d'un trouble homogène; la forme rough (ou R), au contraire, se distingue par l'aspect agglutiné

de sa culture en bouillon. Jugées ainsi, trois des variantes (I, II, III) ont été classées comme S, une (la variante IV) avait des caractères S et R, et les trois autres (V, VII et VIII) des caractères R.

Il est à remarquer que les deux variantes originelles O et T (I et II) sont toutes deux des formes S, d'où il découle que la transformation  $O \rightarrow T$  originelle n'a aucune relation avec la variation classique  $S \rightarrow R$ .

**SENSIBILITÉ AU NaCl.** — La classification des variantes en formes R et S fut confirmée par l'agglutination en présence de chlorure de sodium. Pour cet essai, des cultures sur gélose de seize à vingt-quatre heures furent émulsionnées chacune dans 3 cent. cubes d'eau distillée, puis deux gouttes de chaque émulsion furent ajoutées à des séries de tubes renfermant 1 cent. cube de dilutions croissantes de NaCl (M/1, M/2, M/4, M/8 et M/16) avec un témoin eau distillée. Ensuite, on mettait les mélanges dans un bain-marie réglé à 50° pendant deux à vingt-quatre heures, et on faisait la lecture des agglutinations. Une agglutination positive indiquait des formes R, l'absence d'agglutination, des formes S.

Le tableau II résume les résultats de cet essai.

TABLEAU II. — **Agglutination des variantes par le chlorure de sodium.**

VARIANTE	CONCENTRATION EN NaCl					TÉMOIN H <sup>2</sup> O
	M/1	M/2	M/4	M/8	M/16	
I. . . . .	—	—	—	—	—	—
II. . . . .	—	—	—	—	—	—
IV. . . . .	—	—	—	—	—	—
V. . . . .	+++	++	++	++	+	—
VII. . . . .	+++	+++	+++	++	—	—
VIII (dérivée de III). . .	+++	+++	++	—	—	—
VIII (dérivée de IV). . .	+++	+++	+++	+++	++	—
VIII (dérivée de V). . .	+++	+++	++	+	—	—
VIII (dérivée de VII). . .	+++	+++	+++	++	+	—

Des six variantes que l'on avait en lignée pure au moment de cet essai, trois se comportaient comme des formes R (V, VII et VIII) et trois comme des formes S (I, II et IV).

**MORPHOLOGIE.** — Toutes les variantes, sauf deux (III et VI) se présentent sous la forme des cocco-bacilles d'environ  $0,7\ \mu$  de longueur sur  $0,5\ \mu$  de largeur. La variante III se présente en petits diplocoques et en cocci, et la variante VI en longs bacilles de  $6\ \text{à}\ 10\ \mu \times 0,5\ \mu$ .

D'Hérelle (1929) a bien décrit autrefois une variante en coccus produite sous l'action prolongée du bactériophage pour les microbes du groupe Coli-Typhique-Dysentérique, les Pasteurella et les Vibrions. La figure 3 reproduit des micro-photographies des variantes I et II ; la figure 4 celles des variantes III et IV.

**RÉACTIONS BIOCHIMIQUES.** — Aucune des variantes ne fermente le lactose ; toutes produisent de l'indol. Pour la fermentation des sucres et des alcools usuellement employés dans les laboratoires pour la différenciation des espèces bactériennes, les variantes montraient de légères différences entre elles. Le tableau III résume ces réactions.

TABLEAU III. — Réactions de fermentation des variantes.

VARIANTE	GLUCOSE	MALTOSE	SACCHAROSE	MANNITE	DULCITE	DEXTRINE
I . . . . .	+	+	+	+	+	—
II . . . . .	+	+	+	+	+	±
III . . . . .	+	+	±	+	+	—
IV . . . . .	+	+	+	+	±	—
V . . . . .	+	+	+	+	±	±
VI . . . . .	+	+	+	+	±	±
VII . . . . .	+	+	+	+	±	±
VIII (dérivée de IV)	+	+	+	+	±	M
VIII (dérivée de V)	+	+	+	+	+	M
VIII (dérivée de VII)	+	+	+	+	±	M

M, expérience manquée ; ±, acide d'abord, puis décoloration en quelques jours ; ±, production lente d'acide.

Le glucose, le maltose, la saccharose et la mannite sont fermentés, avec production d'acide seulement, par toutes les variantes, sauf la III, qui ne touche pas la saccharose en vingt-quatre heures et l'attaque seulement après quarante-huit à soixante-douze heures, c'est-à-dire après un temps suffisamment long pour que cette variante ait pu se transformer en descendants IV et VIII.





FIG. 3.

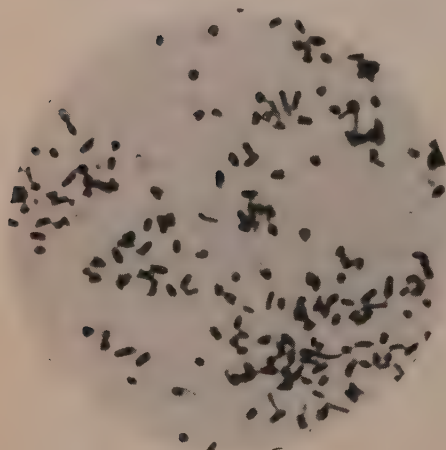


FIG. 3. — A, bacilles et cocco-bacilles d'une colonie O (Variante I); B, bacilles et cocco-bacilles d'une colonie T (Variante II). Gross. : 2.000.

FIG. 4. — A, Longs bacilles filamenteux d'une colonie en tête de Méduse de la variante VI; B, longs bacilles d'une autre colonie de la même variante VI en voie de transformation en variante VII; C, petits diplocoques et cocci de la variante III. Gross. : 1.000.



De même, les formes IV, V, VI et VII ne produisent pas d'acide avec la dulcite en vingt-quatre heures, mais seulement en quarante-huit heures. La dextrine est attaquée par les variantes II, V, VI et VII en vingt-quatre heures; mais, même après trois jours, elle n'est pas attaquée par les variantes I, III et IV. D'après cette fermentation de la dextrine, on peut affirmer que le microbe, qui porte le nom de Harris, s'il est identique sérologiquement au nôtre, correspond à une des variantes II, V, VI ou VII du *B. dysenterix alexandrinus* (Compton), parce que dans la description du microbe de Harris il est dit qu'il fermente la dextrine.

D'autre part, d'après la fermentation constante de la mannite par toutes les variantes, notre microbe ne semble pas être le microbe décrit par Gay et Duval, parce que dans la description de ce dernier, on relève que la mannite est fermentée avec production d'acide en vingt-quatre heures, la réaction devenant alcaline en deux ou trois jours, tandis que le nôtre fermente d'une façon permanente ce composé, aucune décoloration n'étant observée même après six jours.

RÉACTIONS SÉROLOGIQUES. — Ici encore on a rencontré des différences, bien que légères, entre les variantes. La constatation la plus frappante fut que la variante mucoïde-III (produite par l'action du bactériophage) n'est pas agglutinée par les sérums les plus forts des autres variantes. Mais elle produit un anti-sérum ayant une action agglutinante, quoique faible, sur toutes les variantes, sauf sur elle-même.

L'étude de l'action agglutinante nous a donné les résultats indiqués dans le tableau IV.

RÉACTIONS BACTÉRIOPHAGIQUES. — Le bactériophage agit sur toutes les variantes, sauf sur les variantes III et IV (produites par l'action du bactériophage) qui représentent des colonies de résistance.

Le bactériophage employé était une préparation antidysentérique, polyvalente, douée d'une grande activité thérapeutique, et constituée par mélange d'au moins deux types de phages, l'un donnant de petites plages et l'autre de grandes plages avec diverses souches de *B. dysenterix*.

TABLEAU IV. — Agglutination croisée des variantes.

VARIANTE	TITRE de sérum	ANTI-SERA				
		I	II	III	IV	VI
I	1/100. . . . .	+++	+++	++	+++	+++
	1/200. . . . .	+++	+++	++	+++	+++
	1/400. . . . .	+++	+++	+	+++	+++
	1/800. . . . .	+++	+++	—	+++	+++
	1/1.600. . . . .	+++	+++	—	+++	++
II	1/100. . . . .	+++	+++	+++	+++	+++
	1/200. . . . .	+++	+++	++	+++	+++
	1/400. . . . .	+++	+++	++	+++	+++
	1/800. . . . .	+++	+++	—	+++	+++
	1/1.600. . . . .	+++	+++	—	+++	+++
III	1/100. . . . .	+	—	+	—	+
	1/200. . . . .	—	—	—	—	—
	1/400. . . . .	—	—	—	—	—
	1/800. . . . .	—	—	—	—	—
	1/1.600. . . . .	—	—	—	—	—
IV	1/100. . . . .	+++	+++	+++	+++	+++
	1/200. . . . .	+++	+++	+++	+++	+++
	1/400. . . . .	+++	+++	+	+++	+++
	1/800. . . . .	+++	+++	—	+++	+++
	1/1.600. . . . .	+++	+++	—	++	+++
V	1/100. . . . .	+++	+++	+	+++	++
	1/200. . . . .	+++	++	+	+++	—
	1/400. . . . .	+++	+	—	+++	—
	1/800. . . . .	+++	—	—	+++	—
	1/1.600. . . . .	++	—	—	+++	—
VI, VII.	1/100. . . . .	+++	+++	++	++	++
	1/200. . . . .	+++	+++	++	++	++
	1/400. . . . .	+++	+++	+	++	++
	1/800. . . . .	+++	+++	+	++	+
	1/1.600. . . . .	+++	+++	+	+	+

Avec la variante I, la lyse n'est jamais complète et les plages (ou plaques) sont minuscules : avec toutes les autres, sauf les variantes III et IV, la lyse est complète et les plaques sont un mélange de petites et de grandes, celles-ci étant entourées de zones d'action lytique prononcée.

La figure 5 démontre le comportement différent, en grandeur et en type de plage, des variantes I et II envers le même phage.

Il ressort de cette étude que la nature du substrat bactérien joue un grand rôle dans le comportement du bactériophage.

Par un contact prolongé, en attendant que le lysat se trouble par le développement d'une culture secondaire, toutes les

variantes tendent à passer à l'étape mucoïde III (voir le schéma de transformation, fig. 2).

**VIRULENCE.** — Pour cet essai, on s'est servi d'un lot de 28 souris, que l'on a divisé en sept séries de 4. On les a inoculées par voie intrapéritonéale avec des doses de 0 c. c. 1, 0 c. c. 2, 0 c. c. 3 et 0 c. c. 5 de cultures en bouillon glucosé de quarante-huit heures de sept variantes. Les résultats de ces



fig. 5. — A, colonies séparées de la variante I (O); C, colonies séparées de la variante II (T); B, culture en nappe de la variante I contaminée expérimentalement par phage; D, culture en nappe de la variante II contaminée expérimentalement par phage.

expériences sont résumées dans les six premières colonnes du tableau V.

10 animaux sont morts dans les quinze jours qui suivaient l'inoculation. Le tableau précise que les variantes VII et VIII ne sont pas virulentes; les autres se disposent en termes de virulence croissante comme suit : les III et V égales, puis la IV, la II et la I; de sorte que la variante I est la plus virulente de toutes.

À l'autopsie, en ce qui concerne l'action pathogène expérimentale de la variante I, on trouvait une forte congestion des



TABLEAU V.

VARIANTE	ESSAI DE VIRULENCE					ESSAI D'IMMUNITÉ		
	Résultats : Mort (M) ou survie (S) pour les doses suivantes de culture (jour de la mort entre parenthèses jusqu'au 15 <sup>e</sup> jour)					Nombre de souris	Nombre de mort et jour de la mort	Pourcentage de survivants
	0,1 c. c.	0,2 c. c.	0,3 c. c.	0,5 c. c.	Pourcentage mortalité			
I. . . . .	S.	M. (1)	M. (1)	M. (1)	75	1	0	100
II. . . . .	S.	M. (8)	S.	M. (1)	50	2	1 (1)	50
III. . . . .	M. (12)	S.	S.	S.	0-25	3	1 (1)	66
IV. . . . .	M. (9)	M. (9)	S.	M. (15)	50-66	1	0	100
V. . . . .	M. (11)	S.	S.	S.	25	3	1 (8)	66-100
VII. . . . .	S.	S.	S.	S.	0	4	1 (1)	75
VIII. . . . .	S.	S.	S.	S.	0	4	0	100
Témoins (non inoculés). . . . .						4	3 (1)	25

vaisseaux sur de la peau de l'abdomen, pas de liquide dans la cavité abdominale, une rate normale, le foie un peu ramolli, le gros intestin fortement congestionné, la muqueuse parsemée de suffusions hémorragiques sans ulcérations. On a isolé facilement du sang du cœur le microbe inoculé.

Sur les dix-huit animaux survivants, on a fait une deuxième inoculation avec une dose mortelle (0 c. c. 3) de la variante I, pour voir si leur survie pouvait être expliquée par une protection développée à la suite de la première inoculation. Le résultat de cet essai d'immunité est consigné dans les colonnes 7, 8 et 9 du tableau.

Sur 4 animaux qui servaient de témoins, il y eut une survie de 25 p. 100 seulement, contre des survies variant de 50 à 100 p. 100 pour les inoculés.

Au point de vue du pouvoir protecteur, à la suite d'infection fruste, les variantes se rangent en séries croissantes comme suit : la II, puis les III et V égales, la VII, les I, IV et VIII égales. Les trois dernières donnent une protection de 100 p. 100.

POUVOIR IMMUNISANT. — Notre étude précédente sur les animaux ayant survécu à l'épreuve avec des bacilles vivants, nous a indiqué un certain ordre des variantes en pouvoir immunisant croissant, où la variante non virulente VIII se

montre de même efficacité comme productrice d'immunité que la variante la plus virulente I.

Nous nous trouvons ici, en présence d'une question d'une grande importance immunologique, question qui a été à l'ordre du jour depuis Pasteur. Au temps de Pasteur, la vaccination se présentait sous un autre angle qu'aujourd'hui. Alors, elle se faisait soit par l'inoculation de *microbes virulents à faible dose* en les injectant autant que possible par une voie qui ne déterminait pas la mort (par exemple, le virus de charbon symptomatique introduit sous la peau tue les animaux; injecté dans la circulation sanguine il les vaccine), soit par l'inoculation de *microbes atténués* par le vieillissement ou par l'emploi d'antiseptiques. C'est plus tard que Wright introduisit dans la pratique courante la vaccination par les *microbes tués* par la chaleur, permettant ainsi de les injecter sans distinction sous la peau ou dans la veine.

En outre, ce dernier procédé a permis l'emploi soit de microbes virulents, issus des premiers passages sur les milieux de laboratoire, soit de microbes moins virulents, provenant de nombreux passages sur milieux artificiels. Or, les opinions sont encore divisées quant à leur valeur comme vaccins de souches bactériennes virulentes et de souches moins virulentes. Certains auteurs, notamment Arkwright (1927), prétendent que seules, les formes virulentes « S » de bactéries tuées, sont efficaces comme vaccins et que les formes « R » ne le sont pas du tout (fig. 5).

Or, une étude plus complète basée sur 42 animaux (souris), que nous avons d'abord immunisés par des injections intrapéritonéales de 0 c. c. 5 soit : 1° de cultures en bouillon de quarante-huit heures des diverses variantes tuées par la chaleur pendant une heure à 60° (vaccin *insoluble*); soit 2° de filtrats obtenus par la lyse bactériophagique de vingt-quatre heures des cultures en bouillon de vingt-quatre heures (vaccin *soluble*), et que nous avons ensuite injectés neuf jours plus tard par voie intrapéritonéale avec une dose d'épreuve deux fois mortelle (0 c. c. 4) d'une culture de quarante-huit heures de la variante I, nous a donné les résultats du tableau VI (voir page suivante).

Ce tableau montre, qu'au point de vue des deux types de vaccin en jeu, lorsqu'il s'agit de vaccin ordinaire *insoluble*, les

TABLEAU VI.

VARIANTES	IMMUNISATION		ESSAI D'IMMUNITÉ		
	Vaccin ordinaire (tué par la chaleur)	Vaccin soluble	Nombre de souris	Nombre des morts en 24 heures	Pourcentage des survies
	cent. cubes	cent. cubes			
I . . . . .	0,5	—	3	1	67
	—	0,5	3	1	67
II . . . . .	0,5	—	3	0	100
	—	0,5	3	1	67
III . . . . .	0,5	—	3	1	67
	—	0,5	3	3	0
IV . . . . .	0,5	—	3	2	33
	—	0,5	3	3	0
V . . . . .	0,5	—	3	3	0
	—	0,5	3	3	0
VII . . . . .	0,5	—	3	2	33
	—	0,5	3	1	67
VIII . . . . .	0,5	—	3	3	0
	—	0,5	2	1	50
Témoins (non inoculés) . . . . .			12	11	8

variantes bactériennes I, II et III (toutes de formes « S », et les deux premières virulentes) donnèrent de très bons résultats prophylactiques; tandis que les variantes V, VII et VIII (toutes des formes « R », non-virulentes) furent d'efficacité presque nulle.

Au contraire, lorsqu'il s'agit de vaccin *soluble* « *phage lysed* », les variantes VII et VIII (formes « R ») agirent presque toutes aussi bien que les variantes I et II (formes « S »). Il faut écarter de notre exposé les variantes III et IV (produits d'action du phage) car, étant de nature phage-résistante, rien du contenu bactérien n'a pu être solubilisé dans les préparations de vaccins solubles avec ces variantes, ce que l'inoculation aux animaux a confirmé.

Il ressort donc de ces essais de vaccination, un fait nouveau d'importance capitale, c'est que lorsqu'on emploie un vaccin *soluble*, il est indifférent de se servir des formes bactériennes « R » ou « S » pour sa préparation; mais, lorsqu'il s'agit d'un vaccin *ordinaire* en suspension, il faut employer uniquement des formes bactériennes « S ». Vu l'importance pratique de cette constatation et son intérêt théorique en ce qui concerne la théorie de l'immunité, nous nous proposons d'en reprendre prochainement l'étude sur une plus grande échelle.

En résumé, la série de transformations par étapes cycliques de la souche de *B. dysenterix alexandrinus* (Compton) que nous venons de décrire, se caractérise par une tendance marquée des formes originales opaques (O) et translucides (T), toutes deux, formes « S » et virulentes, de passer progressivement sur des milieux spéciaux de laboratoire aux formes « R » non-virulentes. En effet, toutes s'acheminent vers une variante unique, VIII, où les transformations sur les milieux de laboratoire semblent pour ainsi dire s'arrêter. Aucun cas de transformation directe en sens inverse R→S n'a été observé. Pour cette transformation, qui se fait évidemment dans la nature, au moment des épidémies, il faudrait de nouvelles expériences pour la réaliser et pour fixer les conditions exactes de sa production.

J'adresse mes vifs remerciements à MM. J. Berc, Grun Bros., au Caire, et au Dr Walter Joel, de l'Hôpital Israélite d'Alexandrie, pour l'aide qu'ils ont bien voulu me donner pour les photographies (fig. 3, 4 et 5) qui illustrent ce mémoire.

## BIBLIOGRAPHIE

- ARKWRIGHT (J. A.). *J. Path. and Bact.*, **24**, 1921, p. 36.  
 ARKWRIGHT (J. A.). *Ibid.*, **30**, 1927, p. 345.  
 BERGEY, *Manual of Determinative Bacteriology* (London), 1926.  
 COMPTON (A.). *Lancet*, 1929, p. 273 et 528.  
 COMPTON (A.). *J. Infect. dis.*, **51**, 1932, p. 428.  
 D'HERELLE (F.), Etudes sur le Choléra asiatique (Alexandrie), 1929, p. 54.  
 GAY et DUVAL, Cité par Macé, 1903.  
 HADLEY (P.). *J. Infect. dis.*, **40**, 1927, 1-312.  
 MACÉ (E.). *Traité de Bactériologie* (Paris), 1913, 2, p. 235.  
 STITT (E. R.). *Practical Bacteriology* (London), 1927, p. 177.  
 TODD (E. W.). *Brit. J. Exper. Path.*, **9**, p. 1.



**RECHERCHES BIOCHIMIQUES**  
**SUR *BACTERIUM TUMEFACIENS* SMITH ET TOWNSEND**

**ÉTUDE COMPARATIVE**  
**DE DEUX VARIÉTÉS DE POUVOIR PATHOGÈNE DIFFÉRENT**

par M<sup>lle</sup> G. AMOUREUX.

(*Institut Pasteur. Laboratoire de M. A. Berthelot.*)

Depuis la découverte par E. F. Smith de *Bacterium tumefaciens*, agent pathogène du cancer des plantes, de nombreux travaux, surtout d'ordre biologique, ont été effectués par des bactériologistes et des phytopathologistes. Ayant eu l'occasion de participer à diverses recherches poursuivies par MM. J. Magrou et A. Berthelot sur quelques questions relatives à ce microbe, je me suis intéressée d'une façon toute particulière à l'étude des caractères biochimiques de cette bactérie; et j'ai essayé de comparer entre elles deux variétés de *B. tumefaciens* présentant des différences de spécificité dans leur pouvoir pathogène.

Je dois les deux souches de *B. tumefaciens* dont je me suis servie à la grande obligeance de M. J. Magrou. La souche dénommée *B. tumefaciens* H. avait été isolée de tumeurs de Houblon. Celle que je désignerai sous le nom de *B. tumefaciens* Ant. provenait d'une tumeur d'Anthémis. Toutes deux déterminent la formation de lésions néoplasiques lorsqu'on les inocule à des *Pelargonium*, des Ricins ou des Betteraves. Ces plantes, suivant la variété utilisée pour l'inoculation, réagissent, ou différemment, ou plus ou moins tardivement, mais sont réceptives. Au contraire, *B. tumefaciens* H. est pathogène pour le Houblon sans l'être pour l'Anthémis, et, réciproquement, *B. tumefaciens* Ant. provoque des tumeurs sur l'Anthémis, mais non sur le Houblon (1).

(1) Pour le détail des expériences, voir ma thèse (Sciences) Univ. de Paris, 1934.

## PREMIÈRE PARTIE

ETUDE DES CARACTÈRES GÉNÉRAUX  
DES DEUX VARIÉTÉS

## I. — Caractères microscopiques.

*Forme et disposition des éléments.* — Dans les préparations fixées par la chaleur et colorées par les couleurs d'aniline [cultures de dix-huit heures en eau peptonée (pept. pancr. de panse à pH=7,5) ou en gélose ordinaire (bouillon de bœuf peptoné à pH=7,5)], *B. tumefaciens* H. et *B. tumefaciens* Ant. se présentent sous forme d'éléments assez courts, aux extrémités un peu renflées. Ce sont généralement de petits bacilles ou des coccobacilles, groupés souvent en chaînettes de 2 ou 3 éléments de tailles différentes, reliés par des ponts muqueux et contenus dans une même gaine. On trouve, dans un même groupe, des éléments presque sphériques et des éléments coccobacillaires sensiblement plus longs et plus gros qui retiennent plus fortement la couleur. Certains sont nettement plus larges au milieu qu'aux extrémités; d'autres, au contraire, semblent plus minces au milieu. Enfin, on en voit en forme de massues. Dans une même portion de voile microbien on trouve donc des éléments de toutes formes et d'intensités colorantes très diverses.

Il semble qu'il y ait peu de différences entre les deux variétés. En général, pourtant, *B. tumefaciens* H. serait formé de chaînettes de deux éléments moins cocciformes, assez régulièrement colorés, et présentant fréquemment l'apparence de navettes. *B. tumefaciens* Ant., au contraire, aurait un polymorphisme plus accentué et se présenterait assez souvent sous forme de gouttelettes.

*Dimensions.* — Les éléments de *B. tumefaciens* H. présentent dans les cultures de dix-huit heures, soit en eau peptonée, soit en gélose inclinée, les dimensions suivantes : largeur : 0  $\mu$  7; longueur 1  $\mu$  5 à 2  $\mu$  5. La largeur des éléments

de *B. tumefaciens* Ant., dans les mêmes conditions de culture, est de  $0\ \mu\ 7$ . à  $0\ \mu\ 9$ ; leur longueur varie entre  $0\ \mu\ 7$  et  $2\ \mu\ 5$ . Ces deux variétés se présentent souvent sous la forme de coccobacilles de  $0\ \mu\ 7$  de longueur, groupés par deux.

*Mobilité.* — Les éléments de la variété H. sont, pour la plupart, très mobiles, alors que ceux de la variété Ant. le sont beaucoup moins.

*Capsules.* — Après coloration par la méthode de Johnne, *B. tumefaciens* H. et Ant. cultivés sur gélose ou en eau peptonée, se sont montrés dépourvus de capsule.

*Caractères de coloration.* — Les deux variétés ne restent jamais colorées par la méthode de Gram, lorsqu'on les traite par le violet de gentiane phéniqué, par la solution iodo-iodurée et qu'on les décolore par l'alcool-acétone de M. Nicolle. Toutes deux se colorent bien par les couleurs d'aniline, mais *B. tumefaciens* Ant. présente assez souvent un espace central plus clair.

## II. — Caractères physiologiques:

*Formes de résistance.* — Levine, en 1925 [43], indiquait la formation possible de spores dans les cultures sur gélose de pommes de terre glucosée. Il ne me semble pas qu'aucun autre auteur ait jamais confirmé ce résultat. Pour ma part, dans les conditions d'expérience où je me suis placée (milieu, concentration en ions H, temps, température), je n'ai jamais pu déceler la présence de spore soit par examen à l'état frais, soit sur des préparations spécialement colorées.

*Action de l'oxygène.* — *B. tumefaciens* H. et Ant. sont tous deux aérobies.

*Action de la chaleur.* — L'optimum de température est, pour les deux variétés, de  $28^{\circ}$ .

La température mortelle, en bouillon à  $\text{pH}=7,3$ , est comprise entre  $50^{\circ}$  et  $53^{\circ}$ , pour un temps d'action de quinze minutes.

*Influence de la réaction du milieu.* — En gélose ou en eau peptonée, la réaction optima est comprise entre  $\text{pH}=6$  et  $\text{pH}=8$ . Bechhold et L. Smith [3] indiquent que *B. tumefaciens* est peu sensible aux changements de réaction du milieu et qu'il

peut se développer en bouillon entre  $\text{pH} = 5,4$  et  $\text{pH} = 8,2$ .

*Pouvoir pathogène.* — Sur *Pelargonium* les tumeurs produites par les deux souches ne sont guère différentes; celles produites par *B. tumefaciens* Ant. se dessèchent légèrement plus vite et sont un peu moins grosses (taille d'un pois); mais leur aspect général est le même.

### III. — Caractères généraux des cultures.

#### A. — MILIEU D'ORIGINE ANIMALE.

*Bouillon de bœuf* ( $\text{pH} = 7,5$ ). — En vingt-quatre heures, *B. tumefaciens* H. trouble faiblement le bouillon; dès le troisième jour, il se forme des flocons qui persistent encore après huit jours. *B. tumefaciens* Ant., au contraire, donne de larges traînées filamenteuses, après vingt-quatre heures; dès le deuxième jour, il se forme un dépôt abondant au fond du tube et le bouillon reste clair.

*Bouillon de bœuf glucosé* ( $\text{pH} = 7,5$ ) et *Bouillon Martin glucosé*. — Après trois jours à  $30^\circ$  une collerette apparaît; celle-ci tombe très vite dans le cas de *B. tumefaciens* Ant., plus lentement dans les tubes correspondant à la variété H.

*Eau peptonée* (pept. pancr. de panes 20 p. 1.000;  $\text{pH} = 7,5$ ). — On retrouve les mêmes différences: pour *B. tumefaciens* H., tendance à former une collerette importante; les cultures de *B. tumefaciens* Ant. sont moins troubles et présentent, au contraire, un dépôt filamenteux.

*Eau peptonée glucosée* (pept. pancr. de panes 20 p. 1.000; glucose 20 p. 1.000,  $\text{pH} = 7,5$ ). — Les cultures, sur ce milieu, présentent les mêmes caractères qu'en bouillon glucosé mais apparaissent plus tardivement.

*Gélose ordinaire* ( $\text{pH} = 7,3$ ). — Le milieu, après quarante-huit heures, se recouvre d'un enduit gras abondant qui se colore en jaune brun après quinze jours environ. Par piqure, la culture se limite presque exclusivement à la surface de la gélose sous forme d'un enduit jaunâtre. En boîtes de Petri, les deux variétés présentent des colonies rondes, grasses, peu surélevées, toutes semblables.



*Gélose glucosée* (glucose 20 p. 1.000). — La culture est très lente. Après une semaine, cependant, le milieu est recouvert d'un enduit jaunâtre semblable à celui observé sur gélose ordinaire.

*Gélose lactosée tournesolée*. — En quarante-huit heures à 30°, *B. tumefaciens* H. et Ant. bleuissent la gélose lactosée tournesolée.

*Lait*. — *B. tumefaciens* H. et Ant. donnent une culture sur lait, mais ne le font pas coaguler. En cinq jours, le pH passe de 5,5 à 6,2. Après trois semaines de séjour à 30°, le lait est devenu uniformément ocre.

La variété dont s'étaient servis E. Smith, N. A. Brown et C. O. Townsend [66], dans leur étude sur *B. tumefaciens*, possédait la propriété de coaguler le lait. Kalantarian [39], puis Israilky [36] avaient, au contraire, isolé plusieurs souches sans action coagulante.

*Lait tournesolé*. — Dès les premières vingt-quatre heures, le lait tournesolé est lilas bleuâtre. L'alcalinisation se poursuit, légèrement plus vite pour *B. tumefaciens* H., et vers le cinquième jour les tubes sont entièrement bleus. Ceci est un caractère qui différencie le groupe de *B. tumefaciens* du groupe de *B. radiobacter*.

*Gélatine ordinaire*. — Ensemencées par piqûre dans des tubes de gélatine à 20 p. 1.000 (pH = 6,8), les deux variétés H. et Ant. se développent le long de la piqûre, plus abondamment à la surface qu'à la base; mais, même après un mois de culture à la température du laboratoire, aucune des deux souches ne liquéfie le milieu.

## B. — MILIEU D'ORIGINE VÉGÉTALE.

*B. tumefaciens* étant l'agent pathogène du cancer des plantes, il a semblé qu'il pouvait être intéressant de déterminer comment se comporte ce microbe sur des milieux préparés à l'aide de produits végétaux.

*Eau peptonée Arachide* (hydrolyse pepsique de farine de tourteaux d'Arachide; pH = 7,3) [14]. — Sur ce milieu, en vingt-quatre heures, *B. tumefaciens* H. donne un trouble faible, de même qu'en bouillon ordinaire et en eau peptonée pancréa-

tique de panses. Après trois jours, il y a formation d'une collerette. La variété Ant. donne rapidement des cultures d'aspect glaireux. Vers le troisième jour, il se forme des flocons dans le milieu; puis l'eau peptonée s'éclaircit, alors qu'après huit jours elle est encore trouble si elle a été ensemencée avec *B. tumefaciens* H.

*Gélose à la peptone d'arachide* (eau peptonée Arachide (pH = 7,3) additionnée de 20 p. 1.000 de gélose). — A la surface de la gélose-arachide, on obtient, en quarante-huit heures, comme en gélose ordinaire, et pour les deux souches de *B. tumefaciens*, un enduit blanchâtre abondant, très gras pour *B. tumefaciens* H., plus sec pour la variété Ant.

*Eau peptonée Soya* (pH = 7,5) [15]. — La culture est à peine visible, après vingt-quatre heures à 30°; mais, au quatrième jour, les tubes présentent une collerette importante et un trouble très marqué, particulièrement ceux ensemencés avec *B. tumefaciens* Ant.

*Pomme de terre*. — Sur pomme de terre *B. tumefaciens* H. donne un enduit apparent au bout de quarante-huit heures, d'abord jaunâtre, puis jaune brun dès le cinquième jour. Les pommes de terre ensemencées avec *B. tumefaciens* Ant. se recouvrent, dès le deuxième jour, d'un enduit blanchâtre assez important. La culture brunit à peine et, après huit jours à 30°, a conservé une coloration jaune.

*Carotte*. — *Navet*. — *Céleri-rave*. — Ces racines ne conviennent pas à la culture de *B. tumefaciens*.

*Betterave*. — Sur des macérations de Betterave rouge, liquides ou gélosées (1), *B. tumefaciens* H. et Ant. se différencient très nettement. En milieu liquide, la variété Ant. a toujours donné, après huit jours d'incubation à 30°, une culture nette se présentant sous l'aspect d'un voile gras, très épais et grimpant. Sur gélose, on obtenait, en huit jours, un enduit gras, épais, jaunâtre.

La variété H., au contraire, même après un mois de séjour à 30°, n'a jamais donné la moindre trace de culture sur ces deux milieux à la Betterave.

*Gélose aux haricots*. — Sur gélose-haricots, *B. tumefaciens* H.

(1) Pour la préparation de ces milieux, voir G. AMOUREUX. *Th. Doct. Univ.*, Paris 1934.

donne, en quarante-huit heures, une culture grasse très abondante. La variété Ant. ne donne, même en huit jours, qu'une culture beaucoup plus maigre.

*Crosnes.* — Le bouillon obtenu avec les rhizomes de *Stachys tubrifera* [19] et gélosé à 20 p. 1.000 (pH = 6,2) donne avec les deux variétés H. et Ant., en quarante-huit heures, un enduit épais, gris foncé qui, au bout d'un mois, est beaucoup plus coloré avec *B. tumefaciens* H.

*Gélose au bouillon de Géranium.* — Le bouillon de Géranium (*Pelargonium zonale*) qui a servi à préparer cette gélose avait été obtenu en faisant macérer à froid, puis à l'ébullition, 100 grammes de Géranium haché (feuilles, pétioles et petites tiges) dans un litre d'eau de conduite. Après filtration sur toile et addition de 20 p. 1.000 de gélose, ce milieu, stérilisé à 115° pendant vingt minutes, contrairement à ce que l'on pouvait espérer, n'a permis la culture d'aucune des deux variétés; et pourtant, *B. tumefaciens* H. et Ant. sont capables, dans des conditions favorables, d'utiliser les composés contenus dans les tiges et feuilles de Géranium puisqu'ils forment des tumeurs à leurs dépens.

*Milieu cendres de Géranium + fragments de plantes* (Bette-rave, Oignon, Courge, Poireau, Anthémis, Géranium). — Possédant un milieu semi-synthétique convenant particulièrement à la culture de *B. tumefaciens* [7], j'ai essayé de déterminer si l'introduction de fragments de diverses plantes pourrait apporter des éléments capables de changer l'aspect des cultures.

Seuls les tubes contenant des tiges et feuilles de Géranium n'ont présenté aucune culture après ensemencements respectifs avec les deux variétés et séjour d'un mois à la température de 30°. Ceci confirme les résultats obtenus avec la macération de Géranium. *B. tumefaciens* Ant. donne en présence d'Anthémis une culture particulièrement importante, qui se présente, après huit jours, sous l'aspect d'un voile blanc rosé, épais et plissé. *B. tumefaciens* H., sur ce milieu, ne se différencie sensiblement pas des cultures en liquide non additionné de fragments d'Anthémis et présente un voile blanc jaunâtre, bientôt remplacé par un second voile de couleur blanche.

L'introduction de fragments d'Oignon, de Courge, de Bette-rave ou de Poireau ne change sensiblement pas l'aspect des

cultures des deux variétés. On peut noter cependant que l'Oignon favorise leur développement.

### C. — MILIEUX SYNTHÉTIQUES.

1. *Milieu semi-synthétique aux cendres de Géranium* [7]. — Dès le troisième jour, à 30°, la variété H. trouble uniformément le milieu qui reste clair lorsqu'il est ensemencé avec la souche Ant. Mais, dans les deux cas, un voile épais apparaît après huit jours environ.

2. *Milieu à base d'acide pyruvique* [5]. —

Eau de conduite, en grammes . . . . .	1.000
PO <sup>4</sup> HK <sup>3</sup> . . . . .	3
SQ <sup>4</sup> Mg cristallisé. . . . .	1
CH <sup>3</sup> — CO — COOH . . . . .	5

Cette solution a été amenée à pH = 7,3 avec de l'ammoniaque diluée. Après filtration sur filtre Laurent et stérilisation, le pH se maintient à pH = 7.

Ensemencés dans ce milieu très simple, les deux microbes le troublent uniformément en vingt-quatre heures. Après huit jours à 30°, le pH est passé de 7,0 à 7,7.

3. *Milieu « S-G »*. — La solution correspondant à la composition suivante :

Eau distillée, en grammes . . . . .	1.000
SO <sup>4</sup> H <sup>+</sup> N/1, en centimètres cubes . . . . .	7,5
PO <sup>4</sup> H <sup>3</sup> (à 60°B°), en centimètres cubes . . . . .	3
4 CO <sup>3</sup> Mg. Mg(OH) <sup>2</sup> , 6 H <sup>2</sup> O, en grammes. . . . .	0,25
CO <sup>3</sup> K <sup>2</sup> , en grammes. . . . .	1,5

était amenée à pH = 7,5 avec de l'ammoniaque diluée et stérilisée par chauffage à 115° pendant vingt minutes.

Une deuxième solution B, solution de glucose à 50 p. 100 en poids était, après stérilisation à 110° pendant vingt minutes, ajoutée à A, stérilement, et en quantité suffisante pour obtenir une solution contenant 30 p. 1.000 de glucide. Enfin, une solution tampon C, contenant 19 gr. 94 de PO<sup>4</sup>HNa<sup>2</sup>, 2H<sup>2</sup>O et 2 gr. 9 de PO<sup>4</sup>H<sup>2</sup>K dissous dans l'eau distillée, amenée à 100 cent. cubes et à pH = 7,5, puis stérilisée vingt minutes à



115°, était introduite à la dose de 4 c. c. 4 pour 100 cent. cubes de liquide; elle permettait d'obtenir un milieu à  $\text{pH} = 7,5$  fortement tamponné, puisqu'il contenait environ 17 gr. 5 de phosphates par litre.

Cette solution nutritive convient au développement des deux souches de *B. tumefaciens*. Les deux variétés s'y développent en gardant leurs caractères habituels et respectifs. Après trois semaines à 30°, toutes les cultures ont pris une teinte brune assez foncée.

D'autres milieux analogues obtenus en remplaçant le glucose, soit par 30 p. 1.000 de saccharose, soit par 50 p. 1.000 de glycérol, ont été employés dans l'étude de l'attaque du saccharose et du glycérol par *B. tumefaciens* H. et Ant.

#### D. — CULTURES MASSIVES.

Ces cultures ont été obtenues par la technique de M. Nicolle et Allilaire [51] soit en gélose-peptone pancréatique de panses, soit sur de la gélose-arachide, toutes deux à  $\text{pH} = 7,5$  et gélosées à 30 p. 1.000.

*Aspect.* — Les cultures de quarante-huit heures sont très abondantes. Chaque boîte est recouverte d'un enduit gras très épais et très visqueux sur gélose-arachide, moins épais et moins visqueux sur gélose-peptone pancréatique de panses. Avec *B. tumefaciens* H., le milieu arachide se recouvre d'un enduit très glaireux dont la couche inférieure de teinte rosée est de faible épaisseur; au contraire, la zone supérieure, plus importante, est blanc jaunâtre. *B. tumefaciens* Ant., sur le même milieu, donne un enduit grisâtre plus épais et moins visqueux. L'aspect des cultures des deux variétés est donc nettement différent.

*Odeur.* — Les masses microbiennes provenant de la gélose-arachide possèdent une odeur particulièrement désagréable et nettement différente de celle des cultures sur gélose-peptone-pancréatique de panses. L'odeur de la variété Ant. est plus accusée que celle de la variété H.

*Poids.* — La peptone d'arachide a permis d'obtenir, par boîte de Nicolle, un rendement moyen de 23 grammes. avec *B. tumefaciens* H. et de 25 grammes avec la variété Ant. Ces chiffres

sont de beaucoup supérieurs à ceux que l'on obtient avec la gélose-peptone-pancréatique de pansees dont le poids moyen de la récolte n'est que de 4 grammes par boîte. Cette différence peut être expliquée en partie par une abondance plus grande de mucilage lorsque les deux variétés sont cultivées sur milieu arachide. Mais la détermination de l'extrait montre que le rendement brut en poids sec est réellement supérieur lorsqu'on emploie le milieu végétal dosé.

#### Extraits secs.

VARIÉTÉ MICROBIENNE	MILIEU D'ORIGINE ANIMALE		MILIEU D'ORIGINE VÉGÉTALE	
	Extrait sec p. 100	Extrait sec par boîte	Extrait sec p. 100	Extrait sec par boîte
H. . . . .	22,5	0,90	8,8	2,02
Ant. . . . .	22,8	0,91	9,6	2,40

### IV. — Caractères biochimiques.

#### A. — ACTION SUR LES COMPOSÉS TERNAIRES.

1° ACTION SUR LES GLUCIDES ET LES ALCOOLS PLURIVALENTS. — Pour étudier l'action des deux variétés de *B. tumefaciens* sur les glucides et les alcools plurivalents en eau peptonée, je me suis servie de la technique indiquée par A. Berthelot [4] et utilisée par F. G. Valle Miranda [71]. J'indiquerai simplement ici les résultats obtenus (1).

En utilisant une technique analogue, mais en milieu synthétique T. M. [1], l'acidification est plus importante et plus rapide parce que, dans ce cas, la formation d'acides n'est probablement pas compensée par la production très abondante d'ammoniaque libérée aux dépens de la peptone.

2° ACTION SUR LES ACIDES ACYCLIQUES. — Il pouvait être intéressant de déterminer quels sont les sels d'acides acycliques

(1) Pour le détail des expériences, voir : *Thèse, loc. cit.*

## Valeurs des pH obtenus en milieu peptoné.

GLUCIDE	pH du témoin	pH après 4 jours à 30°		pH après 10 jours à 30°	
		H.	Ant.	H.	Ant.
Arabinose . . . . .	7,1	6,9	6,8	7,5	7,2
Xylose . . . . .	7,2	6,9	6,8	6,2	7,1
Rhamnose . . . . .	7,2	7,2	7,3	7,6	8,0
Sorbose . . . . .	7,3	7,2	7,6	7,5	8,0
Fructose . . . . .	7,3	7,0	7,0	6,4	7,3
Glucose . . . . .	7,3	7,2	7,2	6,5	7,3
Mannose . . . . .	7,3	7,4	7,5	6,2	7,6
Galactose . . . . .	7,3	7,2	7,1	6,9	7,6
Maltose . . . . .	7,3	7,2	7,2	6,7	7,5
Lactose . . . . .	7,3	7,2	7,5	7,0	7,5
Saccharose . . . . .	7,4	7,2	7,2	6,6	7,6
Raffinose . . . . .	7,4	7,3	7,6	7,7	7,9
Arbutoside . . . . .	7,3	7,1	7,4	7,2	7,8
Esculosine . . . . .		6,2	6,0	6,5	
Salicoside . . . . .		7,5	7,6	7,1	7,4
Méthylglucoside $\alpha$ . . . . .	7,4	7,8	7,8	7,7	7,8
Méthylglucoside $\beta$ . . . . .	7,4	7,8	7,8	7,7	7,8
Mannitol . . . . .	7,4	7,2	7,4	7,7	7,7
Dulcitol . . . . .	7,5	7,4	7,6	7,6	7,8
Erythritol . . . . .	7,4	7,4	7,6	7,8	8,0
Sorbitol . . . . .	7,6	7,7	7,6	7,8	7,8
Inositol . . . . .	7,4	7,4	7,4	7,8	7,8
Pinitol . . . . .	7,4	7,5	7,6	8,0	7,8
Glycérol . . . . .	7,4	7,2	7,6	7,6	7,8

qui peuvent servir comme régulateurs actifs de la réaction des cultures de *B. tumefaciens* [9-11]. Les acides acycliques fournis comme source de carbone aux deux souches de *B. tumefaciens* ont été introduits dans le milieu en quantités équimoléculaires correspondant à 5 p. 1.000 d'acétate de sodium.

## Valeurs des pH obtenus en milieu synthétique.

GLUCIDE	pH du témoin	pH après 8 jours		pH après 15 jours		pH après 3 semaines	
		H.	Ant.	H.	Ant.	H.	Ant.
Arabinose . . .	6,0	4,7	5,2	4,5	5,0	4,5	4,8
Xylose . . . .	6,0	5,4	5,8	4,7	4,7	4,5	4,7
Fructose . . .	6,0	5,2	5,7	4,8	5,0	4,7	4,8
Glucose . . . .	6,0	5,5	5,7	4,7	4,8	4,7	4,7
Mannose . . . .	6,0	5,0	5,5	4,7	4,7	4,7	4,5
Saccharose . .	6,0	5,0	5,4	4,8	5,0	4,8	4,8

En solution de peptone pancréatique de panse, et pour les deux variétés, l'addition du sel de sodium d'un des acides favorise leur développement. Après dix-huit heures, trois jours, ou huit jours à 30°, cette action est la plus nette, pour *B. tumefaciens* H., avec les acides pyruvique, tartrique, malique et citrique. Avec *B. tumefaciens* Ant., il semble que cette action favorisante soit plus uniforme; pourtant les acides propionique et butyrique ne permettent que des cultures assez faibles, même après huit jours, et le pH de ces tubes reste voisin de 7.

Au contraire, après huit jours à 30°, et pour les deux variétés, il y a alcalinisation très nette de tous ces milieux. Avec *B. tumefaciens* H., les pH les plus élevés correspondent aux sels sodiques des acides malonique, succinique et tartrique, et surtout formique, fumarique et malique. Dans le cas de *B. tumefaciens* Ant., les sels des acides acétique, lactique, malonique, succinique et tartrique donnent un pH compris entre 8,3 et 8,6, et ce sont encore les dérivés des acides formique, fumarique et malique qui déterminent une alcalinité correspondant à  $\text{pH} = 8,8$ .

## B. — ACTION SUR LES COMPOSÉS AZOTÉS.

1° ACTION SUR LES PROTIDES. — a) *Action sur la gélatine et le blanc d'œuf.* — *B. tumefaciens* H. et Ant. ne liquéfient pas la gélatine et n'attaquent pas le blanc d'œuf.

b) *Action sur les peptones.* — Pour cette étude, je me suis servie de peptones pepsiques ou pancréatiques, animales ou végétales (peptone riche en tryptophane, peptone de Witte, peptones d'Arachide pepsique et pancréatique, toutes en solution à 20 p. 1.000; peptones de soie et éreptone, en solution à 10 p. 1.000). Ces diverses eaux peptonées, amenées à  $\text{pH} = 7,3$  avec de la lessive de soude diluée, ont été stérilisées à 115° pendant vingt minutes en tubes de verre vert.

Après quinze jours à 30°, les meilleures cultures des deux variétés avaient été fournies par l'eau peptonée pepsique d'Arachide, alors que la peptone de Witte et l'éreptone n'avaient permis, au contraire, qu'un faible développement.

*Recherche de l'indol.* — D'après E. Smith [63], *B. tumefaciens* produirait une faible quantité d'indol en eau peptonée.



En me servant du réactif d'Ehrlich (*p* diméthylaminobenzaldéhyde) suivant la technique indiquée par A. Berthelot [4], j'ai recherché ce produit dans les cultures obtenues à l'aide de diverses peptones, soit après quarante-huit heures, soit après quinze jours de développement à 30°. Jamais, en employant cette technique, je n'ai pu déceler la présence d'indol dans les cultures des deux variétés H. et Ant.

*Recherche de l'acide indol-3-acétique.* — La recherche de l'acide indol-acétique, effectuée sur des cultures de quatre jours en eau peptonée (p. pancr. de panse) préalablement reconnue exempte d'indol et de corps indologènes libres, n'a donné aucune coloration rose avec le nitrate de sodium et l'acide chlorhydrique.

*Formation de H<sub>2</sub>S.* — E. F. Smith [63] avait indiqué la présence d'hydrogène sulfuré dans les cultures de *B. tumefaciens*. J'ai vérifié, en me servant de gélose p. pancr. de panse additionnée, avant stérilisation, de 1 p. 1.000 d'acétate de plomb, que les deux variétés H. et Ant. produisaient, en quarante-huit heures, de l'hydrogène sulfuré en quantité suffisante pour provoquer la coloration en noir des colonies.

Au contraire, la même technique employée avec de la peptone pepsique-Arachide indiquait que *B. tumefaciens* H. et Ant. ne pouvaient produire de l'hydrogène sulfuré sur ce milieu.

2° ACTION SUR LES ACIDES AMINÉS. — Cette étude a été effectuée à l'aide de la technique et du milieu indiqués par A. Berthelot [4-6].

Après dix-huit heures, *B. tumefaciens* H. et Ant. fournissent des cultures abondantes dans les milieux contenant de l'asparagine, de l'acide aspartique ou de l'acide glutamique. L'alanine, l'histidine, la proline, la cystine et la sarcosine permettent un développement des deux variétés; celui-ci ne se produit pas avec le glycocolle, la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane. Seules la leucine et la lysine sont attaquées, faiblement il est vrai, par *B. tumefaciens* Ant., sans l'être par la variété H.

Après trois et huit jours, il est très net que c'est d'abord en présence d'acide glutamique, puis d'acide aspartique, d'aspara-

gine, de proline, d'histidine et d'arginine que l'on obtient les meilleures cultures.

L'alcalinisation de tous ces milieux est très marquée et correspond à des pH compris entre 7,7 et 8,4, voire même 8,8 ou 9,0 pour les cultures en milieux aspartique et glutamique.

3° ACTION SUR LES AMINES. — a) *Amines comme unique source de carbone.* — L'azote a été fourni sous forme de sulfate d'ammonium ajouté à la dose de 3,88 p. 1.000.

La bétaine, la guanidine, et surtout la choline, peuvent constituer pour *B. tumefaciens* H. et Ant. une source de carbone nécessaire à leur développement.

b) *Amines comme unique source d'azote.* Le carbone était fourni sous forme de glucose ajouté à la dose de 5 p. 1.000. La bétaine, la guanidine et la choline peuvent constituer pour les deux variétés H. et Ant. leur unique source d'azote.

c) *Amines seules sources de carbone et d'azote.* — De toutes les amines étudiées (triméthylamine, diéthylamine, amylamine, choline, glucosamine, neurine, putrescine, éthylènediamine, créatine, guanidine, bétaine, *p*-oxyphényl-éthylamine, pyridine, pipéridine, hordénine), en milieu synthétique ne contenant ni glucose, ni sulfate d'ammonium, seules la bétaine, la créatine et surtout la glucosamine, ont permis d'obtenir un développement des deux variétés H. et Ant. La choline, au contraire, n'a pu être assimilée, à la fois comme source de carbone et d'azote, que par *B. tumefaciens* H.

4° ACTION SUR L'URÉE ET L'ALLANTOÏNE. — Avec la même technique que celle utilisée pour les acides aminés, mais avec des solutions filtrées sur bougies L<sub>5</sub>, l'urée et l'allantoïne n'ont permis d'obtenir, avec *B. tumefaciens* H. et Ant., qu'un développement microbien très faible, rapidement autolysé, sans doute par suite de l'élévation du pH final. En effet, ces milieux, et tout particulièrement ceux additionnés d'urée, se sont alcalinisés très fortement et le pH est passé, en dix jours, de pH = 7,2 à pH = 8,8.

5° ACTION SUR LES COMPOSÉS AZOTÉS MINÉRAUX. — a) *Utilisation de l'azote ammoniacal.* — Dans les milieux qui ont servi

à étudier les caractères biochimiques des deux variétés H. et Ant., l'ammoniaque a été souvent la seule source d'azote. Il a semblé qu'il était donc suffisant de noter que l'azote introduit sous cette forme permettait le développement de *B. tumefaciens* H. et Ant.

b) *Action sur les nitrates.* — E. Smith, N. A. Brown et C. O. Townsend (1911) [66] ont indiqué que *B. tumefaciens*, en bouillon additionné de nitrate, ne pouvait réduire celui-ci. Israilky (1929) [38] possédait une souche de *B. tumefaciens*, isolée de nodosités de lupin, qui pouvait attaquer les nitrates, mais très lentement.

Comme il ne m'a pas été matériellement possible jusqu'ici d'effectuer les extractions et analyses de gaz qui m'auraient permis de déterminer à quel groupe appartenaient les deux variétés, j'ai simplement constaté un léger pouvoir dénitrifiant de *B. tumefaciens* H. et Ant.

## DEUXIÈME PARTIE

### ÉTUDE BIOCHIMIQUE COMPARATIVE DES DEUX VARIÉTÉS

#### I. — Action sur les composés ternaires.

##### A. — ACTION SUR LES GLUCIDES.

Des cultures, soit en eau peptonée additionnée ou non de carbonate de calcium, soit en milieux synthétiques, ont servi à rechercher, après des intervalles de temps divers, les composés alcooliques, aldéhydiques ou cétoniques, les acides volatils ou fixes qui résultent de l'activité microbienne de *B. tumefaciens* H. et Ant. sur ces milieux. De plus, ces bactéries étant essentiellement aérobies, M. le professeur G. Bertrand m'a vivement conseillé d'étudier spécialement les produits d'oxydation qui auraient pu se former dans les cultures additionnées de glucose, de fructose et d'arabinose.

*Glucose.*

1° *Cultures en eau peptonée glucosée* (p. pancr. de pansees 20 p. 1.000 additionnée de 20 p. 1.000 de glucose et amenée à pH=7, puis stérilisée par un chauffage de trois quarts d'heure à 115°). — *B. tumefaciens* H. et Ant. alcalinisent fortement ce milieu dont le pH passe de la valeur 7,5, obtenue après trois semaines, à la valeur 8,5 ou 8,8 notée après quatre mois.

La proportion de composés ammoniacaux est notable. L'alcool n'a pu être décelé qu'en quantités minimales. D'autre part, les traces de composés aldéhydiques sont si peu importantes qu'elles ne permettent qu'une recoloration très légère du réactif de Schiff.

La proportion d'acides volatils élaborés est faible. Israilky [37] avait noté qu'en bouillon sucré additionné de peptone (glucose 10 ou 15 p. 1.000), la formation des acides volatils par *B. tumefaciens* était insignifiante. Cependant, de l'acide acétique se forme dans les deux cas, surtout au début du développement. Puis, après quatre mois, la proportion d'acide valérianique est devenue notablement plus forte que celle de l'acide acétique et correspond sensiblement à 3 parties d'acide valérianique pour 1 partie d'acide acétique (variété H.), et même 5 parties d'acide valérianique pour 1 partie d'acide acétique (variété Ant.),

La présence d'aucun acide fixe n'a pu être décelée ni après trois semaines, ni après quatre mois de développement à 30°.

En opérant sur 10 litres de culture, la présence d'aldéhyde n'a pu être décelée qu'avec la variété Ant. et je n'ai jamais trouvé d'acétone.

Les acides volatils ont été produits en proportion excessivement faible; les courbes des distillations de Duclaux correspondent sensiblement à celle de l'acide acétique, avec pourtant un léger point d'inflexion vers le bas causé par la présence de traces (1/20 environ de la teneur en acide acétique) d'acide valérianique. D'ailleurs, en pratiquant deux distillations, l'une sur les produits de tête, l'autre sur les produits de queue, on obtenait bien deux courbes dont l'une indiquait une proportion plus grande d'acide valérianique.



La recherche des acides fixes dans ces 10 litres de cultures a permis de déceler la présence de faibles traces d'un produit présentant les réactions d'un acide-alcool. Mais je ne peux affirmer s'il s'agissait de l'acide lactique, puisque je n'ai pu en faire le sel de zinc.

2° *Cultures en eau peptonée glucosée additonnée de carbonate de calcium.* — Afin de favoriser l'élaboration des acides dans les cultures, j'ai additionné l'eau peptonée d'une bouillie de carbonate de calcium, suivant la technique précisée par A. Berthelot et M<sup>lle</sup> Chaduc [47].

E. F. Smith et ses collaborateurs [61] indiquent qu'après huit ou neuf semaines, ils ont pu déceler la présence d'aldéhyde, d'alcool, d'acétone, d'acide formique dans toutes leurs cultures de *B. tumefaciens* en eau peptonée (peptone de Witte 10 p. 1.000 additionnée d'un peu de  $\text{CO}_2\text{Ca}$ ), et la formation d'acide acétique seulement à partir de quelques souches. Jamais ils n'ont pu caractériser la présence d'un acide fixe. Dans les cultures âgées de deux mois et demi, ces mêmes auteurs trouvaient encore de l'aldéhyde et de l'acide formique, mais ne pouvaient déceler ni alcool, ni acétone.

Après trois semaines à 30°, les cultures de *B. tumefaciens* H. et Ant. en eau peptonée glucosée additonnée de carbonate de calcium présentaient une réaction correspondant environ à  $\text{pH} = 6$ . J'ai pu noter la formation abondante, par les deux variétés, de produits ammoniacaux et de quantités très faibles d'alcool et d'aldéhyde. La proportion d'acides volatils obtenus est peut-être moins minime qu'en eau peptonée glucosée simple, mais elle reste toujours peu importante. Cependant, les courbes des distillations de Duclaux permettent de déterminer approximativement que les proportions d'acide acétique et d'acide valérianique formés sont dans le rapport de 1 à 15 pour la variété H. et de 1 à 4 pour la variété Ant. C'est donc encore, dans ce cas, les cultures de *B. tumefaciens* Ant. qui sont les plus riches en acide valérianique.

*Recherche spéciale de la formation d'acide oxalique.* — En eau peptonée pepsique-arachide (peptone 20 p. 1.000; glucose 20 p. 1.000,  $\text{pH} = 7,5$ ) additonnée ou non de  $\text{CO}_2\text{Ca}$ , je n'ai pu déceler la formation d'acide oxalique après deux mois de séjour à 30°.

*Recherche spéciale de la formation d'acétylméthylcarbinol.* —

Le choix de la peptone employée dans cette recherche semble être assez important. En effet, des cultures obtenues à 30° en eau peptonée glucosée (peptone Chapoteaut 10 p. 1.000, glucose 20 p. 1.000), amenée à pH = 7,5 avec une solution diluée de soude et stérilisée à 115° pendant vingt minutes, ont donné une réaction de Lemoigne (formation de nickel-diméthylglyoxyme) toujours négative avec *B. tumefaciens* H.; mais, déjà après quinze jours, et surtout après trois semaines, celle-ci était nettement positive avec *B. tumefaciens* Ant., alors que, dans les mêmes conditions, les deux variétés ensemencées en solution de peptone pancréatique de panses ne donnaient pas d'acétylméthylcarbinol. Il semble qu'on ne puisse pourtant pas conclure à une propriété biochimique différente des deux variétés. En effet, puisqu'il a fallu prendre certaines précautions avant d'obtenir un résultat positif avec *B. tumefaciens* Ant., on peut espérer que d'autres conditions de développement permettront la production d'acétylméthylcarbinol par la variété H.

3° *Milieu synthétique glucosé.* — Voici, déterminés après divers temps d'incubation à 30°, les pH des cultures obtenues en milieu synthétique [1] et l'acidité correspondante.

VARIÉTÉ	36 HEURES		3 JOURS		6 JOURS		8 JOURS		16 JOURS
	pH	acidité acétique p. 1.000	pH	acidité acétique p. 1.000	pH	acidité acétique p. 1.000	pH	acidité acétique p. 1.000	pH
H. . . . .	6,3	0,270	5,8	0,300	5,6	0,324	5,4	0,300	4,6
Ant. . . . .	6,6	0,222	6,4	0,267	5,8	0,304	5,8	0,276	4,7

Des dosages de sucre effectués par la méthode de Bertrand sur des cultures de seize jours déféquées avec le réactif de Patein, ont permis d'établir les quantités de glucose consommé par les deux variétés. La proportion trouvée n'était que de 1,2 p. 1.000 avec la variété Ant., alors que, dans le même temps, le chiffre obtenu avec *B. tumefaciens* H. correspondait déjà à 3,4 p. 1.000 de glucose. L'attaque de ce glucide par

cette variété est donc environ trois fois plus importante qu'avec *B. tumefaciens* Ant.

4° *Recherche spéciale de la formation d'acide pyruvique aux dépens du glucose.* — Après vingt-quatre heures, trois jours ou dix jours à 30°, les cultures de *B. tumefaciens* H. et Ant. en milieu synthétique ( $H^2O:1.000$ ,  $PO^4H^3K:3$ ,  $SO^4Mg:1$ ,  $SO^4Am^3:1$ , glucose : 20) simple ou additionné de  $CO^2Ca$  ont toujours donné une réaction négative avec le nitro-prussiate de sodium en solution acétique et addition d'ammoniaque.

5° *Recherche des produits d'oxydation du glucose* (en milieu synthétique [1], ou en eau de levure préparée suivant la technique de G. Bertrand). — Les milieux étaient répartis par 1.500 cent. cubes dans des matras de Fernbach afin de favoriser les phénomènes d'oxydation en offrant une large surface de contact entre l'air et le liquide.

*Recherche de l'acide gluconique.* — Après trois semaines, celle-ci était effectuée selon la technique indiquée par G. Bertrand dans son étude biochimique de la bactérie du sorbose. Mais les précipités calciques étaient tellement faibles qu'il était impossible d'essayer de les recristalliser et d'y doser le calcium afin de s'assurer que le calcium dosé correspondait bien au calcium calculé d'après la formule du gluconate.

Malgré l'absence de formation d'acide gluconique, j'ai essayé de déterminer si *B. tumefaciens* H. et Ant. pouvaient oxyder cet acide, non pas produit dans les cultures à partir du glucose, mais introduit dans les milieux sous forme de gluconate de calcium, et former de l'acide oxygluconique (Boutroux) [27]. Les résultats de mes essais ont été négatifs.

*Recherche de l'acide glycuronique.* — Cette recherche a été effectuée, d'une part, en se servant de la réaction de Legal, et d'autre part, à l'aide de la naphto-résorcine. Là encore les résultats se sont toujours montrés négatifs.

### *Arabinose.*

Après dix-huit jours à 30°, les cultures obtenues en milieu synthétique additionné de 20 p. 1.000 d'arabinose présentaient un pH nettement acide et égal à 4,8.

(1) Thèse. *Loc. cit.*, p. 72.

TÉMOIN	ACIDITÉ en acide acétique	SUCRE consommé
Témoin. . . . .	0,240	—
H. . . . .	0,336	1,40
Ant. . . . .	0,300	1,12

La recherche de l'acide arabonique selon la méthode indiquée par C. Bertrand [20] s'est toujours montrée négative.

### *Fructose.*

Le milieu synthétique employé et la dose de glucide ajouté ont été les mêmes que dans les deux cas précédents.

Après dix jours à 30° les deux variétés avaient produit une acidification du milieu dont le pH était passé de la valeur 7 à la valeur 6,2 dans le cas de *B. tumefaciens* Ant. et même 5,0 avec *B. tumefaciens* H.

TÉMOIN	ACIDITÉ en acide acétique	SUCRE consommé
Témoin. . . . .	0,246	—
H. . . . .	0,320	2,0
Ant. . . . .	0,270	0,9

On peut donc déduire que les deux variétés H. et Ant. attaquent le fructose avec des vitesses très différentes dont l'une, correspondant à la variété H., est double de l'autre. Ceci confirme la remarque déjà faite que *B. tumefaciens* H. présente une activité plus grande vis-à-vis des glucides.

Les cultures obtenues sur ces milieux sont peu riches en acides volatils, particulièrement celles obtenues après ensemencement avec la variété H.

Bien que les composés suivants ne se forment que par oxydation énergique du fructose, j'ai recherché spécialement les acides tartrique et oxalique, l'acide glycolique selon la méthode indiquée par Blanchetière dans des essais analogues [24].

Toutes ces réactions se sont montrées négatives.

### *Saccharose.*

Utilisant le milieu synthétique S. G. (voir p. 737), additionné de 30 p. 1.000 de saccharose, j'ai effectué deux séries



de dosages après quinze jours de culture à 30° : les premiers, avant inversion, pour déterminer la quantité de sucre interverti produit par les bactéries ; les seconds, après inversion pour doser le sucre total des cultures (sucre interverti formé et saccharose non attaqué).

	SACCHAROSE présent par litre	SUCRE interverti par litre
Témoin. . . . .	27,93	1,92
H. . . . .	12,27	10,25
Ant. . . . .	11,16	8,17

On peut en déduire les quantités de saccharose consommé par les deux variétés de *B. tumefaciens*.

	SACCHAROSE consommé par litre de milieu	PROPORTION de saccharose consommé p. 100
H. . . . .	15,16	54,2
Ant. . . . .	16,77	60,4

La petite quantité de sucre interverti dosée dans le témoin est due vraisemblablement à l'action de l'eau et des constituants du milieu sur le saccharose, sous l'influence de la température élevée de la stérilisation et du séjour prolongé à 30°. Sous réserve qu'il faudrait en tenir compte dans les calculs et puisqu'il s'agit d'une comparaison entre les deux variétés H. et Ant., il semble qu'il soit pratiquement suffisant de noter, d'une part que *B. tumefaciens* H. possède le pouvoir de transformer plus facilement le saccharose en sucre interverti, et d'autre part, que la quantité de saccharose consommé est plus importante avec la variété Ant.

#### *Amidon.*

En présence de peptone (p. pancr. de panse 15 p. 1.000), l'attaque de l'amidon est très nette. Après quatre jours à 30°, *B. tumefaciens* H commence à liquéfier le milieu. Les deux empois sont presque complètement fluides au bout de la première quinzaine, mais ne réduisent pas la liqueur cupropotassique même à chaud. Après trois semaines, le pH est passé de 6 à 7.

Il ne se forme dans ces conditions ni acétone, ni alcool, ni acide oxalique ou lactique, mais de faibles quantités d'aldéhyde, d'acide acétique et de maltose.

## B. — ACTION SUR CERTAINS ALCOOLS PLURIVALENTS.

### *Glycérol.*

Après trois semaines ou cinq mois à 30°, les cultures des deux variétés H. et Ant., en milieu synthétique S. G. (p. 737) additionné de 50 p. 1.000 de glycérol, ne réduisent pas la liqueur cupro-potassique à froid. Elles ne contiennent donc ni dioxycétone, ni aldéhyde glycérique, ni méthylglyoxal, ni acétylméthylcarbinol. Je n'ai pu déceler la présence que de traces d'aldéhyde et la recherche de l'acroléine par la méthode de Voisenet [72] s'est montrée également négative.

### *Mannitol et Sorbitol.*

En milieu synthétique [4 p. 70], additionné de mannitol ou de sorbitol, *B. tumefaciens* H. et Ant. donnent des cultures abondantes, mais, après un mois de séjour à 30°, les milieux ne réduisent pas la liqueur cupro-potassique.

Ils ne contiennent donc ni fructose ni sorbose.

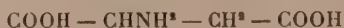
## C. — ACTION SUR L'ACIDE PYRUVIQUE.

Après onze jours de culture à 30° sur milieu synthétique [4 p. 89], la réaction de Lemoigne (formation de nickeldiméthylglyoxime) est nettement positive dans le cas de la variété H., plus fortement positive avec la liqueur provenant d'une culture correspondante de *B. tumefaciens* Ant.

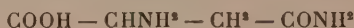
Ceci, d'une part, confirme les résultats faiblement positifs déjà obtenus indiquant que l'acétylméthylcarbinol pouvait être un des produits élaborés dans certaines conditions de milieu par *B. tumefaciens* H. et Ant. et, d'autre part, que cet acétylméthylcarbinol pouvait se former par action directe de certains microbes sur l'acide pyruvique [5-53].

## II. — Action sur certains composés azotés.

J'avais remarqué en étudiant qualitativement l'action de *B. tumefaciens* H. et Ant. sur les milieux additionnés d'acides aminés que l'acide aspartique gauche



et son amide l'asparagine gauche



permettaient d'obtenir des cultures très abondantes avec ces deux variétés.

Pour étudier l'action de ces microbes sur des produits azotés plus complexes j'avais intérêt à choisir une peptone aussi dégradée que possible et riche en acides aminés. J'ai donc adopté la peptone pancréatique de panses « Defresnes » (eau peptonée à 20 p. 1.000 amenée à  $\text{pH} = 7,2$ ).

Je n'indiquerai ici que les références bibliographiques des techniques spéciales employées (1) : dosages de l'azote total des cultures (Kjeldahl), de l'ensemble de l'azote aminé et de l'azote ammoniacal (Sørensen) [68], de l'azote ammoniacal seul (Foreman) [32], et, quand cela était possible, dosage de l'azote des acides aminés et des polypeptides (Martens) [49]. En effet, comme R. Martens l'indique d'ailleurs, cette dernière méthode n'est pas applicable à l'étude des milieux additionnés d'asparagine ou d'acide aspartique.

### A. — ACTION SUR LA PEPTONE PANCRÉATIQUE DE PANSES.

RÉSULTATS QUALITATIFS. — Les milieux ensemencés avec *B. tumefaciens* H. et Ant. ont été conservés à 30° soit pendant un mois, soit pendant un an. Ils présentaient une réaction alcaline correspondant à  $\text{pH} = 8,5$  ou 8,8 et les cultures jeunes ou très anciennes ne contenaient ni composé alcoolique, ni

(1) Pour le détail, voir *Thèse. loc. cit.*, p. 90 et suiv.

composé cétonique, ni acide fixe. On ne pouvait y déceler que des traces d'aldéhyde. Toutes les recherches effectuées pour essayer de caractériser la présence d'amines volatiles ou fixes, de choline, d'acides ou d'amines cycliques ou hétérocycliques, d'indol, n'ont apporté aucun résultat positif.

La teneur en acides volatils d'après les distillations de Duclaux est, dans tous les cas, peu importante, particulièrement après un mois de séjour à 30°. Il semble, en effet, que cette proportion soit environ trois fois plus faible que dans les mêmes cultures âgées de un an. Comme je l'avais déjà remarqué en étudiant la formation d'acides volatils dans les cultures de *B. tumefaciens* H. et Ant. sur eau peptonée additionnée de glucose, après un mois à 30° on trouve surtout de l'acide acétique, avec des proportions plus ou moins grandes d'acide valérianique (environ 1 partie d'acide valérianique pour 3 parties d'acide acétique dans le cas de la variété H., et seulement 1 partie d'acide valérianique pour 10 parties d'acide acétique dans les cultures de la variété Ant.).

Mais, au contraire, après un an, les cultures de *B. tumefaciens* Ant. sont nettement plus riches en acide valérianique que celles de la variété H. En effet, on peut déceler alors, et plus facilement, les proportions d'acide valérianique et d'acide acétique.

*B. tumefaciens* H. : acide valérianique 1 + acide acétique 4.

*B. tumefaciens* Ant. : acide valérianique 4 + acide acétique 1.

#### RÉSULTATS QUANTITATIFS :

##### 1° Cultures d'un mois.

	TÉMOIN (p. 1.000)	H (p. 1.000)	ANT (p. 1.000)
N total (Kjeldahl) . . . . .	2,71	2,54	2,63
N ammoniacal (Foreman) . . . . .	0,056	0,616	0,392
N (acides aminés + NH <sup>3</sup> ) (Sørensen). . . . .	0,808	1,053	1,004
N fonctions amines des acides aminés et polypeptides (Martens) . . . . .	1,032	1,340	1,248
N (acides aminés) (Martens). . . . .	0,399	0,493	0,519
N (fonctions amines des polypeptides) (Martens). . . . .	0,405	0,468	0,498
COOH des acides aminés et polypep- tides (Martens). . . . .	2,925	3,618	3,717



Après un mois à 30°, les résultats obtenus à l'aide des dosages d'azote total indiquent que la quantité de protides attaqués par *B. tumefaciens* H. est plus grande que celle correspondant à la variété Ant. De plus, cette première variété est capable, probablement à cause de son activité biochimique déjà plusieurs fois reconnue comme supérieure, de pousser plus loin la désintégration de la peptone. En effet, la proportion d'acides aminés formés est légèrement plus faible et au contraire la quantité d'ammoniaque beaucoup plus grande dans les milieuxensemencés avec la variété H.

## 2° Cultures d'un an.

	H (p. 1.000)	ANT (p. 1.000)
N total (Kjeldahl). . . . .	1,460	1,350
N ammoniacal (Foreman). . . . .	0,245	0,350
N (acides aminés + NH <sup>3</sup> ) [Sørensen] . . . . .	0,616	0,436
N (fonctions amines des acides aminés et des polypeptides (Martens) . . . . .	0,918	0,796
N (acides aminés) [Martens] . . . . .	0,280	0,157
N (fonctions amines des polypeptides) [Martens].	0,526	0,472
COOH (des acides aminés et polypeptides) [Martens] . . . . .	2,840	2,170

On peut déduire des résultats indiqués ci-dessus que la teneur en azote total des deux cultures n'est pas très différente. Mais cet azote est inégalement réparti. La proportion d'ammoniaque est, en effet, beaucoup plus grande, et celle des acides aminés beaucoup plus faible, dans les milieuxensemencés avec la variété Ant. Ceci explique pourquoi la réaction des cultures de *B. tumefaciens* Ant. est toujours légèrement plus alcaline.

Naturellement, en raison du degré de précision si différent des méthodes employées, on ne peut tenir compte, en valeur absolue, des résultats de ces dosages; mais ils sont quand même à retenir pour les comparaisons qu'ils permettent d'établir entre les deux variétés H. et Ant.

Il faut remarquer que, dans l'état actuel de nos connaissances, on ne peut pas, dans le calcul du bilan azoté des cultures microbiennes aérobies, attribuer un rôle aussi important qu'autrefois au chiffre d'azote total fourni par la méthode de Kjeldahl. En effet, tout récemment M. Lemoigne, F. Dopter et R. Desveaux [42] ont montré que dans les cultures âgées il y a

souvent un déficit important de l'azote ainsi titré. Ces auteurs ont constaté qu'à partir du quinzième jour environ, ce déficit s'accroît peu à peu, et peut atteindre et même dépasser 30 p. 100 de l'azote initial. Ces pertes, d'ailleurs, sont très irrégulières. Les bactéries produisant ce phénomène sont des espèces banales des eaux, des milieux naturels, et notamment du sol; il est donc fort possible qu'il se produise dans les cultures de *B. tumefaciens*.

## B. — ACTION SUR L'ACIDE ASPARTIQUE.

Pour cette étude, j'ai utilisé le milieu suivant :

Eau distillée, en grammes . . . . .	1.000
PO <sup>4</sup> HK <sup>2</sup> . . . . .	1,5
PO <sup>4</sup> K <sup>3</sup> . . . . .	8
SO <sup>4</sup> Mg cristallisé . . . . .	0,75
Solution oligodynamique (gouttes) . . . . .	V
Acide aspartique gauche, en grammes . . . . .	5

amené à pH = 6,5 avec une solution de lessive de soude diluée, réparti en fioles coniques, puis stérilisé à 115° pendant vingt minutes.

Après deux mois de séjour à 30°, de nombreux cristaux de phosphate ammoniaco-magnésien s'étaient déposés dans ces cultures dont la réaction était très alcaline (pH = 8,2). Après filtration, et en employant les procédés indiqués plus haut, j'ai essayé de caractériser les produits formés. Je n'ai pu déceler la présence d'alcoylamines, d'amines, d'amino-alcools, de diamines, de composés imidazoliques.

J'ai recherché si *B. tumefaciens* H. et Ant. produisaient, dans l'attaque de l'acide aspartique, les composés signalés par A. Blanchetière pour le Bacille fluorescent [25] et E. Aubel pour le Bacille pyocyanique [2]. Je n'ai pu mettre en évidence la formation soit des acides propionique, azotique ou formique, soit celle des acides succinique, malique et malonique.

### Cultures de trois semaines.

	TÉMOIN (p. 1.000)	H (p. 1.000)	ANT (p. 1.000)
N total (Kjeldahl) . . . . .	0,574	0,276	0,346
N ammoniacal (Foreman) . . . . .	0	0,196	0,224
N (acides aminés + NH <sup>3</sup> ) [Sørensen].	0,466	0,193	0,280

De ces résultats on peut déduire qu'après trois semaines de séjour à 30° l'acide aspartique a disparu complètement dans le cas de la variété H. et presque totalement dans les milieux ensemencés avec *B. tumefaciens* Ant. Il s'est formé une grande proportion d'ammoniaque, légèrement plus faible cependant dans les cultures correspondant à la variété H.

### C. — ACTION SUR L'ASPARAGINE.

J'ai utilisé la solution suivante :

Eau distillée, en grammes . . . . .	1.000
PO <sup>4</sup> HK <sup>3</sup> . . . . .	1,5
PO <sup>4</sup> H <sup>3</sup> K. . . . .	2,5
SO <sup>4</sup> Mg cristallisé. . . . .	0,75
Solution oligodynamique (gouttes) . . . . .	V
Asparagine, en grammes. . . . .	5

dont le pH, égal à 6,5 est demeuré le même après stérilisation à 115° pendant 20 minutes dans des fioles coniques de verre Sibor.

Après deux mois à 30°, le milieu témoin était resté incolore et limpide alors que les cultures de *B. tumefaciens* H. et Ant. étaient colorées en jaune brun et présentaient un abondant dépôt de phosphate ammoniaco-magnésien. La réaction des milieux ensemencés correspondait à pH = 8,2 alors que la solution témoin était demeurée à pH = 6,5.

#### Cultures de deux mois.

	TÉMOIN (p. 1.000)	H (p. 1.000)	ANT (p. 1.000)
N total (Kjeldahl) . . . . .	0,980	0,483	0,512
N ammoniacal (Foreman) . . . . .	0	0,336	0,370
N (acides aminés + NH <sup>3</sup> ) [Sørensen].	0,367	0,354	0,375
N (du phosphate ammoniaco-magnésien). . . . .	0	0,036	0,032

Puisque dans les titrages d'asparagine un seul atome est décelable par la méthode au formol, et sous réserve des phénomènes de rétrogradation si complexes rappelés par A. Blanchetière, qui aboutiraient à la synthèse de produits n'intervenant sans doute pas dans le dosage Sørensen, il semble que l'on puisse conclure que les deux variétés H et Ant. attaquent l'asparagine avec une même énergie.

## III. — Etude des activités diastasiques.

E.-F. Smith ayant constaté que le suc des tumeurs de Bette-rave exposé à l'air devenait rapidement noir comme de l'encre, divers auteurs, étudiant après lui les caractères physiologiques de *B. tumefaciens*, ont recherché si cet agent pathogène pouvait former des oxydases *in situ* et les laisser diffuser dans le tissu néoplasique. En 1927, Israilky [37] indiquait la présence d'oxydases, de catalase et d'un ferment protéolytique dans des tumeurs qui s'étaient développées sur des Raves. Il importait également de rechercher, dans les cultures ou les extraits de *B. tumefaciens*, les plus importantes des diastases qui pouvaient s'y trouver.

Dans ce but, j'ai examiné, d'une part des cultures en milieu liquide synthétique, soit filtrées, soit totales, mais tuées par le chloroforme, d'autre part des extraits bactériens. Pour obtenir ceux-ci je me servais de corps microbiens récoltés par la technique de M. Nicolle et Allilaire et je préparais des extraits glycérolés (1 partie de corps microbiens + 2 ou 3 parties de glycérol), des extraits autolytiques aqueux chloroformés, et des poudres de bacilles traités par l'acétone. J'ai préparé également des extraits au saccharose (stérilisés par l'éther) selon la technique de A. Berthelot [28].

Soit pour les cultures autolysées, soit dans le cas d'extraits microbiens employés à des dilutions variées, j'ai pratiqué tous mes essais en suivant scrupuleusement les indications données par G. Bertrand [23], H. Colin [29] ou M. W. Onslow [52]; de plus, je me suis placée, pour chaque cas particulier, dans les conditions de pH, de température et de temps qui correspon-daient à l'optimum de l'activité diastasique. Mais, malgré les précautions prises, je n'ai pu déceler la présence dans les solutions étudiées d'aucune des diastases suivantes : sucrase, lactase, dextrinase, amylase, protéidase, présure, laccase, tyrosinase, peroxydiastases ou uréase. Par contre, les extraits glycérolés ou autolytiques des corps microbiens des deux variétés H et Ant. m'ont permis de caractériser la présence d'une catalase déjà trouvée par Israilky dans les tumeurs des plantes.



Or, les déterminations biochimiques que j'ai rapportées dans le présent travail ont montré que si *B. tumefaciens* est sans action sur la gélatine et l'ovalbumine, et s'il ne détermine pas la coagulation du lait, il attaque nettement le saccharose, l'amidon et plus faiblement l'urée.

Les résultats qualitatifs et quantitatifs obtenus dans l'étude des milieux additionnés de saccharose montrent l'existence évidente d'une sucrase. Il semble qu'on puisse également affirmer, d'une part la présence d'une dextrinase et d'une amylase, d'autre part celle d'une uréase. Il y aurait donc lieu de conclure que chez *B. tumefaciens* ces quatre diastases sont nettement endocellulaires, qu'elles sont étroitement liées à la vie et à la substance du cytoplasme, et qu'elles ne diffusent pas dans le milieu extérieur, au moins dans les conditions d'expérience où je me suis placée.

Quant aux autres enzymes que plusieurs expérimentateurs n'ont pu déceler dans les tumeurs causées par *B. tumefaciens* et que j'ai également recherchés en vain dans les cultures, les produits d'autolyse et les extraits de la bactérie pathogène, il est possible que certains d'entre eux ne soient pas élaborés par ce microbe ; d'autres le sont peut-être, mais restent toujours intracellulaires, cytoplasmiques, et font en quelque sorte partie intégrante de la matière vivante. Par des artifices mécaniques, ou en faisant varier considérablement les conditions physico-chimiques de l'autolyse des corps microbiens, peut-être arriverait-on à mettre en évidence quelque une de ces diastases.

Toutefois, au point de vue pathogénique, l'étude de l'action de *B. tumefaciens* sur les substances pectiques peut présenter quelque intérêt. J'ai donc essayé de déterminer la gélification à 30° d'une solution à 3 p. 100 de pectine sèche de Citron additionnée de 0,15 p. 100 de Cl<sup>2</sup>Ca. J'étudiais parallèlement, et l'action des solutions aqueuses de mes extraits microbiens, et celle d'une solution de pectase de Carotte préparée suivant G. Bertrand et Mallevre [22]. Alors que, dans les mêmes conditions, la gélification de la pectine nécessitait, avec cette pectase, un temps variant entre trois et huit heures, mes solutions d'origine bactérienne n'ont jamais provoqué cette gélification, même en quarante-huit heures, et malgré la précaution que j'avais prise de ramener les liqueurs à pH = 6.

Les deux variétés de *B. tumefaciens* ne semblent donc pas élaborer de pectase; mais il est possible que l'enzyme recherché existe dans la bactérie vivante et manifeste son action dans les tissus de la plante parasitée.

En ce qui concerne la production d'une diastase capable d'hydrolyser les composés pectiques, j'ai soumis de petits fragments de racine de Betterave, de tige, de pétiole ou de feuille d'Anthémis, pendant trois semaines, à l'action des produits élaborés par *B. tumefaciens* H. et Ant., ou diffusés dans les milieux par l'autolyse des corps microbiens. Malgré le développement exubérant des cultures et le temps d'action très prolongé, aucune apparence de désagrégation ou de modification des tissus végétaux n'était visible ni à l'œil nu, ni au microscope après coloration par l'oxychlorure de ruthénium.

Contrairement à ce qui se passe avec d'autres bactéries pathogènes pour les végétaux supérieurs, *B. tumefaciens* ne semble donc pas produire de « pectinase » dans les conditions de mes expériences, ou, du moins, s'il en élabore ce serait une pectinase endocellulaire, difficile à séparer du cytoplasme ou se détruisant à mesure de sa diffusion dans le milieu extérieur.

En résumé, il est évident que si l'on considère la diversité des problèmes que posent la biologie de *B. tumefaciens* et le mécanisme de son action pathogène, les résultats que je viens d'exposer sont de minime importance. Ils montrent cependant que les deux variétés que j'ai examinées ne présentent pas des propriétés biochimiques très différentes, et, par conséquent, c'est ailleurs qu'il faut chercher les causes de la divergence de leur action pathogène.

Des circonstances indépendantes de ma volonté m'ont obligé à publier les premiers résultats de mon travail alors que celui-ci était loin d'avoir atteint le développement que je souhaitais lui donner. De nouvelles recherches que M. A. Berthelot et moi-même poursuivons actuellement sur d'autres points de la biochimie et de la physiologie de *B. tumefaciens*, ainsi que sur la composition chimique des tumeurs comparée à celle des tissus normaux nous donneront peut-être des résultats plus encourageants.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] AMOUREUX (M<sup>lle</sup> G.), Recherches biochimiques sur *Bacterium tumefaciens* Smith et Townsend. Etude comparative de deux variétés de pouvoir pathogène différent. *Th. Doct. Univ. Paris*, 1934.
- [2] AUBEL (E.), Recherches biochimiques sur la nutrition du Bacille pyocyanique. *Th. Doct. ès Sc.*, 1921.
- [3] BECHHOLD (H.) et SMITH (L.), Das Tumefaciens-plastin. *Ztschr. f. Krebsf.*, **25**, 1927, p. 97-104.
- [4] BERTHELOT (A.), Recherches sur le *Proteus vulgaris*. Ces *Annales*, **28**, 1914, p. 839.
- [5] BERTHELOT (A.), Recherches biochimiques sur l'acide pyruvique. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **6**, 1924, p. 326.
- [6] BERTHELOT (A.), Remarques sur l'emploi des milieux synthétiques. Ces *Annales*, **40**, 1926, p. 440.
- [7] BERTHELOT (A.), Sur un milieu de culture artificiel convenant particulièrement au *B. tumefaciens*. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **12**, 1930, p. 109.
- [8] BERTHELOT (A.), Milieux chimiquement définis et milieux naturels. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **12**, 1930, p. 1025.
- [9] BERTHELOT (A.), Sur les régulateurs de la réaction des cultures microbiennes. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **14**, 1932, p. 280.
- [10] BERTHELOT (A.), Nouvelles remarques d'ordre chimique sur le choix des milieux de culture naturels et sur la manière de formuler les milieux synthétiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934. Séance du 3 juillet.
- [11] BERTHELOT (A.) et AMOUREUX (M<sup>lle</sup> G.), Remarques sur l'emploi des sels d'acides gras comme régulateurs de la réaction des cultures microbiennes. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **14**, 1932, p. 286.
- [12] BERTHELOT (A.) et AMOUREUX (M<sup>lle</sup> G.), Sur quelques milieux synthétiques propres à l'étude de *B. tumefaciens*. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934. Séance du 3 juillet.
- [13] BERTHELOT (A.) et AMOUREUX (M<sup>lle</sup> G.), Sur la préparation des milieux de culture à base de peptone pepsique de tourteaux d'arachide. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934. Séance du 3 juillet.
- [14] BERTHELOT (A.), AMOUREUX (M<sup>lle</sup> G.) et PETIT (D.), Remarques sur la composition des peptones de tourteaux d'arachide et sur leur application à la culture des microbes pathogènes. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **12**, 1930, p. 1029.
- [15] BERTHELOT (A.), AMOUREUX (M<sup>lle</sup> G.) et VAN DEINSE (F.), Sur les avantages de la peptone pepsique de tourteaux de Soya pour la préparation des milieux de culture, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934. Séance du 3 juillet.
- [16] BERTHELOT (A.) et BERTRAND (D.-M.), Recherches sur la flore intestinale. Isolement d'un microbe capable de produire de l'imidazoléthylamine aux dépens de l'histidine. *C. R. Ac. Sc.*, **154**, 1912, p. 1643.
- [17] BERTHELOT (A.) et CHADUC (M<sup>lle</sup> M.), Remarques sur l'emploi du carbonate de calcium en microbiologie. *Revue d'Hygiène*, n° 1, janvier 1927.
- [18] BERTHELOT (A.), PRÉVOT (A.-R.) et KARL (G.), Les amines biologiques de M. Guggenheim (édition française). Éd. Ballière, 1934 (voir Guggenheim).
- [19] BERTHELOT (A.), VAN DEINSE (F.) et AMOUREUX (M<sup>lle</sup> G.), Sur l'emploi des Crosnes dans la préparation des milieux de culture. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934. Séance du 3 juillet.

- [20] BERTRAND (G.), Étude biochimique de la bactérie du sorbose. *Ann. Chim. et Phys.*, **3**, 1904 (8), p. 181.
- [21] BERTRAND (G.), Le dosage des sucres réducteurs. *Bull. Soc. Pharmacol.*, n° 1, janvier 1907.
- [22] BERTRAND (G.) et MALLÈVRE (A.), Sur la diffusion de la pectase dans le règne végétal et sur la préparation de cette diastase. *C. R. Ac. Sc.*, **121**, 1893, p. 726.
- [23] BERTRAND (G.) et THOMAS (P.), Guide pour les manipulations de chimie biologique, 2<sup>e</sup> éd., Dunod et Pinal, Paris, 1913.
- [24] BLANCHETIÈRE (A.), Contribution à l'étude biologique de quelques variétés du genre *Sporotrichum* pathogènes pour l'homme. *Th. Doc. Méd.*, Paris, 1909.
- [25] BLANCHETIÈRE (A.), Action du bacille fluorescent liquéfiant de Flügge sur l'asparagine en milieu chimiquement défini. *Ces Annales*, **31**, 1917, p. 291; **34**, 1920, p. 392.
- [26] BOUGAULT (J.), Recherche et caractérisation de l'acide malonique. *Journ. Pharm. Chim.*, **8**, 1913, p. 280.
- [27] BOUTROUX, Sur une fermentation acide du glucose. *C. R. Ac. Sc.*, **102**, 1886, p. 924-927.
- [28] CALMETTE (A.), BOQUET (A.) et NÈGRE (L.), Manuel technique de microbiologie et sérologie, 3<sup>e</sup> édit., p. 84, 152, 170. Masson, Paris, 1933.
- [29] COLIN (abbé H.), Les diastases. 1 : Les hydrolases. Doin, Paris, 1931.
- [30] DUCLAUX (E.), Sur le dosage des alcools et des acides volatils. *Ces Annales*, **9**, 1895, p. 265.
- [31] FERNBACH (A.) et SCHOEN (M.), L'acide pyruvique produit de la vie de la levure. *C. R. Ac. Sc.*, **157**, 1913, p. 1478.
- [32] FOREMAN (W.), Rapid volumetric methods for the estimation of amino-acids, organic acids, and organic bases. *Biochem. Journ.*, **14**, 1920, p. 451.
- [33] FROIDEVAUX (J.), Contribution à la recherche de méthodes concernant l'appréciation des phénomènes d'altération, d'autolyse et d'hydrolyse artificielle des produits naturels. *Ann. des Fals.*, n° 195, 1925, p. 19.
- [34] GRIMBERT (L.), Diagnostic des bactéries par leurs fonctions biochimiques. *Ed. Rudeval*, 1903.
- [35] GUGGENHEIM (M.), Les amines biologiques. Édition française par BERTHELOT (A.), PRÉVOT (A.-R.) et KARL (G.), Baillière, Paris, 1934.
- [36] ISRILKY (W. P.), Bakteriophagie und pflanzenkrebs. I. *Centr. f. Bakt.*, **67**, 1926, p. 236, 242.
- [37] ISRILKY (W. P.), Bakteriophagie und pflanzenkrebs. II. *Centr. f. Bakt.*, **71**, 1927, p. 302.
- [38] ISRILKY (W. P.), Vergleichende Untersuchungen über die Rasseneigentümlichkeiten des *B. tumefaciens* und verwandter mikroorganismen. *Centr. f. Bakt.*, **79**, 1929, p. 354.
- [39] KALANTARIAN, Über die Ursache des Krebses oder der Kropfbildung bei der Mandel. *Veröf. d. Land. Centr. in Tiflis*, 1915 (russe).
- [40] KAUFFMANN (F.), Zur Tumefaciensfrage. *Ztschr. f. Krebsf.*, **26**, 1927, p. 18; **28**, 1928, p. 109, 330.
- [41] LEMOIGNE (M.), Réaction spécifique du 2-3 butylèneglycol et de l'acétylméthylcarbinol produits dans la fermentation butylène-glycolique. *C. R. Ac. Sc.*, **170**, 1920, p. 131.
- [42] LEMOIGNE (M.), DOPFER (P.) et DESVEAUX (R.), Sur le bilan de l'azote titrable à la méthode de Kjeldahl dans les cultures microbiennes aérobies. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **16**, 1934, p. 18.



- [43] LÉVINE (M.), Morphological changes in *Bacterium tumefaciens*. *Science*, **62**, 1925, p. 424.
- [44] MAGROU (J.), Tumeurs expérimentales dues au *Bacterium tumefaciens*. *Rev. Path. végét. et Entom. agric.*, **11**, 1924, p. 73.
- [45] MAGROU (J.), Recherches expérimentales sur le cancer des plantes. *Ces Annales*, **38**, 1924, p. 331.
- [46] MAGROU (J.), Les tumeurs des plantes. Travaux de la Clinique chirurgicale de la Salpêtrière, publiés par A. GOSSET, 1926, 1<sup>re</sup> série, p. 141-162.
- [47] MAGROU (J.), Recherches anatomiques et bactériologiques sur le cancer des plantes. Masson, 1927, p. 229.
- [48] MAGROU (J.), Remarques sur la bactériologie et l'anatomie du crown-gall. *Rev. Path. végét. et Entom. agric.*, **14**, 1927, p. 43.
- [49] MARTENS (R.), Considérations sur le dosage séparé des acides aminés et des polypeptides dans les produits de digestion des protéines. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **9**, 1927, p. 454.
- [50] MOLLIARD (M.), Sur une nouvelle fermentation acide produite par le *Sterigmatocystis nigra*. *C. R. Ac. Sc.*, **474**, 1922, p. 881.
- [51] NICOLLE (M.) et ALLILAIRE (E.), Note sur la production en grand des corps bactériens et sur leur composition chimique. *Ces Annales*, **23**, 1909, p. 547.
- [52] ONSLOW (M. W.), Practical Plant biochemistry, 2<sup>e</sup> édit., Cambridge, University Press, 1923.
- [53] OSSART (M<sup>lle</sup> E.), Contribution à l'étude de la production d'acétone par les bactéries. Recherches biochimiques sur deux espèces aérobies. *Th. Doct. Univ.*, Paris, 1924.
- [54] PEIRIER (J.-C.) et NGUYEN (KIM KIN), Dosage rapide des acides aminés et des polypeptides dans le nuoc-mam. *Ann. Falsific. et Fraudes*, **26**, 1933, p. 6.
- [55] REDDICK, DONALD et STEWART (V. B.), Crown-gall of apple and peach with notes on the biology of *B. tumefaciens*. *Cornell Univ. Agr. Exp. Stat. Mem.*, **73**, 1924, p. 49.
- [56] RIKER (A. J.), Studies of crown-gall. *Phytopath.*, **12**, 1922, p. 55.
- [57] RIKER (A. J.), Some relations of the crown-gall organism to its host tissue. *Journ. of Agric. Res.*, **25**, 1923, p. 419.
- [58] SAGEN (H. E.), WRIGHT (W. H.) et RIKER (A. J.), The cultural differentiation of *B. radiobacter* Beij and closely related organisms. *Journ. of Bact.*, **17**, 1929, p. 22.
- [59] SMITH (E. F.), Crown-gall of plants. *Phytopath. Offic. organ. of the amer. Phytopath. Soc.*, **1**, 1911, p. 7.
- [60] SMITH (E. F.), Crown-gall and sarcoma. *U. S. Dept. Agric. B. P.*, **1**, 1911, p. 85.
- [61] SMITH (E. F.), Mechanism of tumor growth in crown-gall. *Journ. of Agric. Res.*, **8**, 1917, p. 163.
- [62] SMITH (E. F.), Production of tumors in the absence of parasites. *Arch. of Dermat. and syphilis*, **2**, 1920, p. 176.
- [63] SMITH (E. F.), An introduction of Bacterial diseases of plants. Philadelphia and London, W. S. Saunders Co, 1920.
- [64] SMITH (E. F.), Twentieth Century advances in cancer research. *Journ. of Radiol.*, **4**, 1923, p. 295.
- [65] SMITH (E. F.) et TOWNSEND (C. O.), A plant tumor of bacterial origin. *Science*, **25**, 1907, p. 671.

- [66] SMITH (E. F.), BROWN (N. A.) et TOWNSEND (C. O.), Crown-gall of plants; its cause and remedy. *U. S. Depart. Agric. B. of Pl. Ind. Bull.*, 1911, p. 213.
- [67] SMITH (C. O.), Crown-gall or plant cancer. *Bull. State Cam. Hort. (California)*, 5, 1916, p. 201.
- [68] SORENSSEN (S. P. L.), Études enzymatiques. I. Sur la mesure quantitative des scissions protéolytiques « Titration au formol ». *C. R. Trav. du Labor. de Carlsberg*, 7, 1907.
- [69] TEUTSCHLAENDER et KRONENBERGER (F.), Ueber Versuche mit *B. tumefaciens*. *Ztschr. f. Krebsf.*, 23, 1926, p. 177.
- [70] TOUMREY (J. W.), An inquiry into the cause and nature of crown-gall. *Ar. Ag. Exp. Sta. Bull.*, 33, 1903, p. 7, 64.
- [71] VALLE-MIRANDA (F. G.), Contribution à l'étude du *Proteus vulgaris* HAUSER (recherches biochimiques comparées sur une race pathogène et saprophyte). *Th. Doct. Univ.*, Paris, 1917.
- [72] VOISENET (B.), Sur une nouvelle réaction colorée de l'acroléine. *Journ. Pharm. Chim.*, 2, 1910, p. 214.
- [73] WRIGHT (W. H.), HENDRICKSON (A. A.) et RIKER (A. J.), Studies on the progeny of single-cell isolation from the hairy-root and crown-gall organisms. *Journ. of Agric. Res.*, 41, 1930, p. 541.
- [74] WRIGHT (W. H.), RIKER (A. J.), SAGEN (H. E.) et BANFIELD (W. M.), Studies on the bacteriological differentiation of the crown-gall and hairy-root types of bacteria. *Phytopath.*, 49, 1929, p. 97.

## LES VACCINATIONS ANTIRABIKUES

A L'INSTITUT PASTEUR EN 1934

par JULES VIALA.

Ce rapport, établi suivant le plan fixé par la Conférence internationale de la Rage, ne concerne que l'année 1934.

### 1° *Personnes traitées :*

496 personnes ont été admises à suivre le traitement antirabique.

### 2° *Méthode de traitement :*

Depuis 1911, l'Institut Pasteur a adopté la méthode de conservation en glycérine (1) des moelles atténuées, introduite dans la pratique par A. Calmette.

On se sert de pots-bans d'une contenance de 50 cent. cubes.

Dans chacun, on verse 25 cent. cubes de glycérine neutre à 30° B°.

On stérilise à 120°, pendant vingt minutes.

On laisse refroidir et on introduit dans chaque pot-ban quelques fragments de moelles préalablement desséchées dans un flacon de potasse, d'après la méthode initiale de Pasteur.

On conserve ces pots-bans à la glacière aux environs de  $+ 0^{\circ}$ .

Pour la vaccination des personnes mordues, on n'utilise que des moelles ayant séjourné moins de *vingt jours en glycérine*, l'expérience ayant démontré que le degré d'atténuation de chaque moelle n'est pas sensiblement modifié pendant les vingt premiers jours.

Les personnes mordues reçoivent journellement, pendant la durée du traitement, qui varie de quinze à vingt-cinq jours, 3 à 4 millimètres de moelle triturée dans 3 centimètres cubes d'eau distillée stérilisée.

(1) Ces *Annales*, 1, 1887, p. 87.

\*  
\* \*

Le virus fixe de passage actuellement utilisé est le même que celui dont on s'est toujours servi depuis la création du service de vaccinations antirabiques, d'abord rue d'Ulm, et ensuite (à partir de 1888) à l'Institut Pasteur.

Pour éviter l'infection de la moelle, on saigne les lapins dès que la paralysie des trains postérieur et antérieur est complète et on extrait immédiatement celle-ci par la méthode d'Oshida, au moyen d'un mandrin métallique nickelé, stérile.

Il convient de signaler que, depuis le *19 août 1911*, les inoculations de passage du virus fixe sont toujours effectuées, non plus avec le bulbe frais de lapin rabique, mais avec le bulbe conservé depuis au moins quarante-huit heures en glycérine à la glacière.

Depuis que cette technique a été adoptée, nous n'avons jamais constaté de modifications dans les délais d'incubation de la maladie après inoculation sous la dure-mère.

\*  
\* \*

Voici le tableau des injections antirabiques :

1 <sup>er</sup> jour (1) . . . . .	Moelle de 5 jours (3 cent. cubes).
2 <sup>e</sup> — (1) . . . . .	— 5 — —
3 <sup>e</sup> — . . . . .	— 4 — —
4 <sup>e</sup> — . . . . .	— 4 — —
5 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
6 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
7 <sup>e</sup> — . . . . .	— 4 — —
8 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
9 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —
10 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
11 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
12 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —
13 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
14 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
15 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —
16 <sup>e</sup> jour . . . . .	Moelle de 4 jours (3 cent. cubes).
17 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
18 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —

(1) A partir du 1<sup>er</sup> janvier 1935, ces moelles sont remplacées par des moelles de quatre jours.



19 <sup>e</sup> jour . . . . .	Moelle de 3 jours (3 cent. cubes).
20 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
21 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —
22 <sup>e</sup> jour . . . . .	Moelle de 3 jours (3 cent. cubes).
23 <sup>e</sup> — . . . . .	— 3 — —
24 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —
25 <sup>e</sup> — . . . . .	— 2 — —

3° Répartition des personnes traitées, d'après le territoire sur lequel elles ont été mordues :

France. . . . .	489
Egypte . . . . .	2
Espagne. . . . .	2
Maroc . . . . .	1
Monaco (Principauté de). . . . .	1
Roumanie . . . . .	1

4° D'après l'espèce de l'animal mordeur :

Chiens de propriétaires connus . . . . .	194
Chiens errants. . . . .	157
Chats de propriétaires connus. . . . .	85
Chats errants . . . . .	43
Bovidé. . . . .	1
Lapins rabiques (animaux de laboratoire). . . . .	3
Singes. . . . .	2
Renard . . . . .	1
Autres animaux . . . . .	13

5° D'après les preuves de rage chez l'animal mordeur :

*Catégorie A.* — La rage de l'animal mordeur a été constatée par le développement de la maladie chez des animaux inoculés avec son bulbe ou par un examen histologique.

*Catégorie B.* — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

*Catégorie C.* — L'animal mordeur est suspect de rage.

Pour un certain nombre de cas de cette catégorie, vu les renseignements fournis par les personnes mordues, la rage était cliniquement presque certaine.

Catégorie A (1) . . . . .	23
Catégorie B . . . . .	51
Catégorie C . . . . .	422

(1) Les centres nerveux des animaux mordeurs sont aussi examinés au Laboratoire national des Recherches vétérinaires d'Alfort, et les résultats sont transmis au service.

6° *D'après le caractère des morsures :*

Profondes . . . . .	414
Superficielles . . . . .	82

7° *Interposition des vêtements :*

Sur la peau nue . . . . .	370
A travers le vêtement . . . . .	126

8° *D'après le siège de la morsure (1) :*

Tête . . . . .	42
Membres supérieurs . . . . .	348
Tronc . . . . .	2
Membres inférieurs . . . . .	104

9° *D'après le nombre de jours écoulés entre la morsure et le traitement :*

0 à 4 jours . . . . .	254
3 à 7 jours . . . . .	97
8 à 14 jours . . . . .	102
15 à 21 jours . . . . .	23
Plus de 21 jours . . . . .	20

10° *Autres renseignements :***Répartition par départements des 489 personnes traitées mordues en France.**

Aisne . . . . .	3	Finistère . . . . .	2
Allier . . . . .	2	Gironde . . . . .	1
Alpes (Hautes-) . . . . .	1	Ille-et-Vilaine . . . . .	35
Ardennes . . . . .	4	Indre . . . . .	6
Aube . . . . .	2	Indre-et-Loire . . . . .	15
Aveyron . . . . .	1	Loire-Inférieure . . . . .	20
Calvados . . . . .	3	Loiret . . . . .	4
Cantal . . . . .	1	Lot . . . . .	1
Charente-Inférieure . . . . .	1	Maine-et-Loire . . . . .	2
Cher . . . . .	2	Manche . . . . .	5
Corrèze . . . . .	2	Marne (Haute-) . . . . .	1
Côte-d'Or . . . . .	2	Mayenne . . . . .	2
Côtes-du-Nord . . . . .	6	Meurthe-et-Moselle . . . . .	4
Doubs . . . . .	2	Morbihan . . . . .	4
Eure . . . . .	5	Nièvre . . . . .	2
Eure-et-Loir . . . . .	6	Oise . . . . .	3

(1) Pour les morsures multiples on indique uniquement le siège de la plus dangereuse.

Orne . . . . .	1	Seine-et-Marne . . . . .	11
Pas-de-Calais . . . . .	2	Seine-et-Oise. . . . .	48
Puy-de-Dôme. . . . .	10	Seine-Inférieure . . . . .	22
Pyrénées-Orientales . . . . .	3	Sèvres (Deux-) . . . . .	4
Rhin (Haut-) . . . . .	1	Somme. . . . .	4
Saône-et-Loire . . . . .	2	Vienne (Haute-) . . . . .	3
Seine { Paris . . . . .	129	Vienne . . . . .	3
{ à l'exclusion de Paris. . . . .	93	Yonne . . . . .	3

Le tableau ci-dessous indique les résultats généraux des vaccinations depuis l'origine.

ANNÉE	PERSONNES traitées	MORTS	MORTALITÉ p. 100	ANNÉE	PERSONNES traitées	MORTS	MORTALITÉ p. 100
1886	2.671	25	0,94	1911	341	1	0,29
1887	2.770	14	0,79	1912	395	0	0,00
1888	1.622	9	0,55	1913	330	0	0,00
1889	1.830	7	0,38	1914	373	0	0,00
1890	1.540	5	0,32	1915	654	1	0,15
1891	1.559	4	0,25	1916	1.388	3	0,21
1892	1.790	4	0,22	1917	1.543	4	0,26
1893	1.648	6	0,36	1918	1.803	3	0,16
1894	1.387	7	0,50	1919	1.813	3	0,16
1895	1.520	5	0,38	1920	1.126	6	0,53
1896	1.308	4	0,30	1921	998	1	0,10
1897	1.529	6	0,39	1922	754	0	0,00
1898	1.465	3	0,20	1923	727	0	0,00
1899	1.614	4	0,25	1924	764	1	0,14
1900	1.420	4	0,28	1925	782	0	0,00
1901	1.321	5	0,38	1926	634	0	0,00
1902	1.005	2	0,18	1927	639	0	0,00
1903	628	2	0,32	1928	671	0	0,00
1904	755	3	0,39	1929	542	0	0,00
1905	721	3	0,41	1930	589	0	0,00
1906	772	1	0,13	1931	531	0	0,00
1907	786	3	0,38	1932	561	0	0,00
1908	524	1	0,19	1933	443	0	0,00
1909	467	1	0,21	1934	496	0	0,00
1910	401	0	0,00				

En examinant le tableau précédent, on constate tout d'abord une diminution très rapide de la mortalité, au cours des cinq premières années (de 0,94 à 0,32 p. 100 de 1886 à 1890).

Puis, la mortalité se maintient pendant trente-trois ans, aux environs de 0,20 à 0,35 p. 100.

Depuis 1922 (exception faite pour l'année 1924), elle s'est maintenue à 0 p. 100.

Or, cette absence de mortalité coïncide avec une modification apportée au traitement antirabique.

En effet, depuis 1921, la durée maxima de la dessiccation des moelles a été ramenée *de dix jours à cinq jours* et à partir de 1933 à *quatre jours*.

Les personnes mordues reçoivent donc, dès le premier jour du traitement, une émulsion de moelle n'ayant subi qu'une dessiccation de *quatre jours*.

Y a-t-il là une relation de cause à effet? L'avenir le montrera.

11° *Mesures prises en vue de poursuivre l'évolution des cas traités pendant six mois au minimum.*

Les médecins et les vétérinaires, ayant adressé des personnes mordues, sont priés de nous tenir au courant des accidents qui pourraient se produire ultérieurement.

12° *Accidents paralytiques* : Néant.

13° *Décès* : Néant.

La statistique pour 1934 s'établit donc ainsi :

Personnes traitées . . . . .	496
Mort. . . . .	0
Mortalité p. 100 . . . . .	0



# TABLE DES MATIÈRES

DU TOME 54

## JANVIER

Essais sur l'immunité antitoxique ( <i>premier mémoire</i> ). De l'action toxique et immunisante de la toxine diphtérique appliquée sur la peau, par G. RAMON et M. DJOURICHITCH. . . . .	5
Études sur la dissociation du <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , par Konrad E. BIRKHAUG . . . . .	19
Études chimiques sur le bacille tuberculeux ( <i>deuxième mémoire</i> ). Extraction fractionnée des diverses substances lipoidiques de bacilles frais et non chauffés, par MACHEBŒUF, J. DIERICK et R. STOOP. . . . .	71
Essai d'évaluation de l'efficacité du vaccin BCG chez les nourrissons, par J. ZEYLAND et M <sup>me</sup> E. PIASECKA-ZEYLAND . . . . .	86
Lésions histologiques des centres nerveux dans la trypanosomiase humaine (à propos de deux cas mortels non traités) par Ivan BERTRAND, J. BABLET et A. SICÉ . . . . .	91

## FÉVRIER

Contribution à l'étude du virus de la maladie d'Aujeszky ( <i>deuxième mémoire</i> ), par P. REMLINGER et J. BAILLY. . . . .	149
Recherches sur la paralysie diphtérique expérimentale, par le Dr G. RUELLE. . . . .	185
Études sur la dissociation du <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , par Konrad E. BIRKHAUG . . . . .	195
Contribution expérimentale à la question de la spécificité des streptocoques, par R. FREUND . . . . .	245
Un nouveau vecteur dans la transmission des hémoparasites des animaux domestiques : <i>Ornithodoros lahorensis</i> , Neumann, 1908, par M <sup>me</sup> A. F. RASTÉGAIEFF. . . . .	250
Le rayonnement mitogénétique. Conférence de M. le professeur GOURVITCH . . . . .	259

## MARS

† L. VAILLARD (1850-1935) . . . . .	269
A propos de l'immunisation locale contre la toxine diphtérique, par A. BESREDEKA . . . . .	273
Remarques à propos de l'action toxique et immunisante de la toxine diphtérique appliquée sur la peau de l'animal d'expérience, par G. RAMON. . . . .	278
Recherches expérimentales sur l'infectiosité spécifique des gan- glions de l'aine chez les paralytiques généraux avant et après des tentatives d'activation locale ou de surinfection, par A. BESSEMAN, J. VAN HÉE et J. VAN HÆLST . . . . .	282
Recherches anatomo-cliniques et expérimentales sur un cas d'encé- phalo-myélite rabique survenue au cours d'un traitement pas- teurien, par G. MARINESCO et State DRAGANESCO. . . . .	299
Du mécanisme d'action de divers composés chimiques sur les toxines bactériennes, par S. SCHMIDT . . . . .	325
Nouvelles recherches concernant l'action du BCG sur le porc, par I. JUNDÉLL et H. MAGNUSSON. . . . .	332
Contribution à l'étude du typhus exanthématique, par Marguerite RONSE . . . . .	341
Sur les pigments caroténoïdes de deux bactéries acido-résistantes, par Erwin CHARGAFF et Edgar LEDERER . . . . .	383

## AVRIL

Virulence de l'ultravirus herpétique administré par voies nasale et digestive; mécanisme de sa neuroproboscie centripète, par C. LEVA- DITI, G. HORNUS et P. HABER . . . . .	389
Recherches sur l'importance du manganèse pour les animaux, par Gabriel BERTRAND et Hiroshi NAKAMURA . . . . .	421
De l'action des sécrétions staphylococciques sur les hémato blasts : leur rôle dans la production des thrombi post-opératoires, par O. GENGOU . . . . .	428
Recherches sur la température critique du sérum ( <i>neuvième mé- moire</i> ). Equilibres ioniques en fonction de la température : le pH, par P. LÉCOMTE DU NOÛY et V. HAMON . . . . .	442
L'immunité des plantes vis-à-vis des maladies à virus, par J. DU- FRÉNOY. . . . .	461

## MAI

† A.-C. MARIE (1866-1935) . . . . .	513
Essais sur l'immunité antitoxique ( <i>deuxième mémoire</i> ). De l'action toxique et immunisante de diverses toxines (abrine, toxine diph- térique, toxine staphylococcique) instillées dans le sac conjon-	

tival chez le lapin, nature et mécanisme de l'immunité ainsi produite, immunité « locale » ou « générale », par G. RAMON et R. RICHOU . . . . .	518
Inoculations oculaires expérimentales des différentes souches de bacilles tuberculeux, par V. MORAX et NIDA . . . . .	556
Tentatives de transmission héréditaire de l'infection syphilitique inapparente chez la souris blanche, par C. LEVADITI, A. VAISMAN, M <sup>lles</sup> R. SCHÖEN et Y. MANIN. . . . .	584
Contribution à l'étude des maladies intestinales du ver à soie, deux types nouveaux de dysenterie non infectieuse, par A. PAILLOT. . . . .	627

## JUIN

† V. MORAX (1866-1935). . . . .	649
L'infection tuberculeuse primitive de la conjonctive chez l'homme. par V. MORAX et E. RIST. . . . .	653
Études sur l'ultravirus tuberculeux ( <i>troisième mémoire</i> ). Sur la culture des « protogènes tuberculeux », par G. SANARELLI et A. ALESSANDRINI . . . . .	676
Prémunition antituberculeuse du cobaye et du lapin nouveau-nés au moyen du BCG absorbé par la voie buccale, par L. NÈGRE . . .	697
Analyse sérologique des différentes fractions lipoidiques du BCG, par E. CHARGAFF et W. SCHAEFER . . . . .	708
Sur la variation microbienne observée dans une souche de <i>B. dysenteriae</i> (groupe Gay-Harris), avec quelques observations nouvelles sur la valeur comparative des vaccins solubles et insolubles en immunologie, par Arthur COMPTON. . . . .	715
Recherches biochimiques sur <i>Bacterium tumefaciens</i> (Smith et Townsend). Etude comparative de deux variétés de pouvoir pathogène différent par M <sup>lle</sup> G. AMOUREUX . . . . .	730
Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1934, par Jules VIALA . . . . .	764

# TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

DU TOME 54

ALESSANDRINI (A.) . . . . .	Voir Sanarelli (G.).	
AMOUREUX (M <sup>lle</sup> G.) . . . . .	Recherches biochimiques sur <i>Bacterium tumefaciens</i> (Smith et Townsend). Etude comparative de deux variétés de pouvoir pathogène différent. . .	730
BABLET (J.) . . . . .	Voir Bertrand (Yvan).	
BAILLY (J.) . . . . .	Voir Remlinger (P.).	
BERTRAND (Gabriel) et NAKAMURA (Hiroshi) . . . . .	Recherches sur l'importance du manganèse pour les animaux. . . . .	421
BERTRAND (Ivan), BABLET (J.) et SICÉ (A.) . . . . .	Lésions histologiques des centres nerveux dans la trypanosomiasse humaine (à propos de deux cas mortels non traités). . . . .	91
BESREDEKA (A.) . . . . .	A propos de l'immunisation locale contre la toxine diphtérique. . . . .	273
BESSEMANS (A.), VAN HÉE (J.) et VAN HÆLST (J.) . . . . .	Recherches expérimentales sur l'infectiosité spécifique des ganglions de l'aîne chez les paralytiques généraux avant et après des tentatives d'activation locale ou de surinfection . .	282
BIRKHAUG (Konrad E.) . . . . .	Études sur la dissociation du <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . . . . .	19
—	Études sur la dissociation du <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (2 <sup>e</sup> partie). . . . .	195
CHARGAFF (Erwin) et LEDERER (Edgar). . . . .	Sur les pigments caroténoïdes de deux bactéries acido-résistantes. . . . .	383
CHARGAFF (E) et SCHAEFER (W.) . . . . .	Analyse sérologique des différentes fractions lipidiques du BCG. . . . .	708
COMPTON (A.) . . . . .	Sur la variation microbienne observée dans une souche de <i>B. dysenteriae</i> (groupe Gay-Harris), avec quelques observations nouvelles sur la valeur comparative des vaccins solubles et insolubles en immunologie. . . . .	715



DIERYCK (J.) . . . . .	Voir Machebœuf (M.).	
DJOURICHITCH (M.) . . . . .	Voir Ramon (G.).	
DRAGANFSCO (State) . . . . .	Voir Marinesco (G.).	
DUFRENOY (J.) . . . . .	L'immunité des plantes vis-à-vis des maladies à virus . . . . .	461
FREUND (R.) . . . . .	Contribution expérimentale à la ques- tion de la spécificité des strepto- coques . . . . .	245
GENGOU (O.) . . . . .	De l'action des sécrétions staphylococ- ciques sur les hémato blastes; leur rôle dans la production des thrombi post-opératoires . . . . .	428
GOURVITCH (professeur). . . . .	Le rayonnement mitogénétique. Con- férence . . . . .	259
HABER (P.) . . . . .	Voir Levaditi (C.).	
HAELST (J. VAN) . . . . .	Voir Bessemans (A.).	
HAMON (V.) . . . . .	Voir Lecomte du Noüy (P.).	
HÉE (J. VAN) . . . . .	Voir Bessemans (A.).	
HORNUS (G.) . . . . .	Voir Levaditi (C.).	
JUNDELL (I.) et MAGNUSSON (H) . . . . .	Nouvelles recherches concernant l'ac- tion du BCG sur le porc . . . . .	332
LECOMTE DU NOÛY (P.) et HA- MON (V.) . . . . .	Recherches sur la température critique du sérum ( <i>neuvième mémoire</i> ). Equi- libres ioniques en fonction de la température : le pH . . . . .	442
LEDERER (Edgar) . . . . .	Voir Chargaff (Erwin).	
LEVADITI (C.), HORNUS (G.) et HABER (P.) . . . . .	Virulence de l'ultravirus herpétique administré par voie nasale et diges- tive; mécanisme de sa neuropro- basie centripète . . . . .	389
LEVADITI (C.), VAISMAN (A.), Mlles SCHÖEN (R.) et MA- NIN (Y.) . . . . .	Tentatives de transmission héréditaire de l'infection syphilitique inappa- rente chez la souris blanche . . . . .	584
MACHEBŒUF (M.), DIERYCK (J.) et STOOP (R.) . . . . .	Extraction fractionnée de diverses sub- stances lipoidiques de bacilles frais et non chauffés . . . . .	71
MAGNUSSON (H.) . . . . .	Voir Jundell (I.).	
MANIN (Y.) . . . . .	Voir Levaditi (C.).	
† MARIE (A.-C.) . . . . .	(1866-1935) . . . . .	513

MARINESCO (G.) et DRAGANESCO (State) . . . . .	Recherches anatomo-cliniques et expérimentales sur un cas d'encéphalomyélique rabique survenue au cours d'un traitement pasteurien . . . . .	299
MORAX (V.) . . . . .	(1866-1935) . . . . .	649
MORAX (V.) et NIDA (M.) . .	Inoculations oculaires expérimentales des différentes souches de bacilles tuberculeux . . . . .	556
MORAX (V.) et RIST (E.) . . .	L'infection tuberculeuse primitive de la conjonctive chez l'homme . . . .	653
NAKAMURA (Hiroshi) . . . . .	Voir Bertrand (Gabriel).	
NÈGRE (L.) . . . . .	Prémunition antituberculeuse du cobaye et du lapin nouveau-nés au moyen du BCG absorbé par la voie buccale . . . . .	697
NIDA (M.) . . . . .	Voir Morax (V.).	
PAILLOT (A.) . . . . .	Contribution à l'étude des maladies intestinales du ver à soie, deux types nouveaux de dysenterie non infectieuse . . . . .	627
PIASECKA-ZEYLAND (M <sup>me</sup> E.) .	Voir Zeyland (J.).	
RAMON (G.) . . . . .	Remarques à propos de l'action toxique et immunisante de la toxine diphtérique appliquée sur la peau de l'animal d'expérience . . . . .	278
RAMON (G.) et DJOURICHITCH (M.) . . . . .	Essais sur l'immunité antitoxique ( <i>premier mémoire</i> ). De l'action toxique et immunisante de la toxine diphtérique appliquée sur la peau . . . .	5
RAMON (G.) et RICHOU (R.) .	Essais sur l'immunité antitoxique ( <i>deuxième mémoire</i> ). De l'action toxique et immunisante de diverses toxines (abrine, toxine diphtérique, toxine staphylococcique) instillées dans le sac conjonctival chez le lapin, nature et mécanisme de l'immunité ainsi produite, immunité « locale » ou « générale » . . . . .	518
RASTÉGAIEFF (M <sup>no</sup> A. F.) . .	Un nouveau vecteur dans la transmission des hémoparasites des animaux domestiques: <i>Ornithodoros lahorensis</i> , Neumann, 1908 . . . . .	250
REMLINGER (P.) et BAILLY (J.) .	Contribution à l'étude du virus de la maladie d'Aujeszky ( <i>deuxième mémoire</i> ) . . . . .	149

RICHOU (R.) . . . . .	Voir Ramon (G.).	
RIST (E.) . . . . .	Voir Morax (V.).	
RONSE (Marguerite) . . . . .	Contribution à l'étude du typhus exanthématique . . . . .	341
RUELLE (Dr G.) . . . . .	Recherches sur la paralysie diphtérique expérimentale. . . . .	185
SANARELLI (G.) et ALESSANDRINI (A.) . . . . .	Études sur l'ultravirus tuberculeux ( <i>troisième mémoire</i> ). Sur la culture des « protogènes tuberculeux » . . .	676
SCHMIDT (S.) . . . . .	Du mécanisme d'action de divers composés chimiques sur les toxines bactériennes . . . . .	325
SCHÖEN (M <sup>lle</sup> R.) . . . . .	Voir Levaditi (C.).	
SICÉ (A.) . . . . .	Voir Bertrand (Ivan).	
STOOP (R.) . . . . .	Voir Machebœuf (M.).	
† VAILLARD (L.) . . . . .	(1850-1935) . . . . .	269
VAISMAN (A.) . . . . .	Voir Levaditi (C.).	
VIALA (J.) . . . . .	Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1934. . . . .	764
ZEYLAND (J.) et PIASECKA-ZEYLAND (M <sup>me</sup> E.) . . . . .	Essai d'évaluation de l'efficacité du vaccin BCG chez les nourrissons . .	86

Le Gérant : G. MASSON.